



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

EVALUACION DE LA ACTIVIDAD OXIDO-REDUCTORA DE PDI DURANTE LA UNIÓN PDI-TLPs DE ROTAVIRUS EN LA MEMBRANA CITOPASMÁTICA DE VELLOSIDADES INTESTINALES AISLADAS DE RATÓN ICR ADULTO.

HERNÁN MAURICIO RIVERA ESCOBAR

Código. 05599252

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FISIOLÓGICAS
MAESTRÍA EN BIOQUÍMICA
BOGOTÁ
2014**



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

EVALUACION DE LA ACTIVIDAD OXIDO-REDUCTORA DE PDI DURANTE LA UNIÓN PDI-TLPs DE ROTAVIRUS EN LA MEMBRANA CITOPASMÁTICA DE VELLOSIDADES INTESTINALES AISLADAS DE RATÓN ICR ADULTO.

HERNÁN MAURICIO RIVERA ESCOBAR

Tesis de grado como requisito para optar al título Magister en Bioquímica

DIRECTOR:

CARLOS ARTURO GUERRERO FONSECA MD. Msc. PhD.

**Grupo de investigación:
Biología Molecular de virus**

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FISIOLÓGICAS
MAESTRÍA EN BIOQUÍMICA
BOGOTÁ
2014**

AGRADECIMIENTOS

Quiero aprovechar para expresar mi más profundo y sincero agradecimiento a todas aquellos que con su ayuda han colaborado en la realización del presente trabajo, en especial al Dr. Carlos Arturo Guerrero, director de esta investigación, por la orientación, el seguimiento y la supervisión continúa de la misma, pero sobre todo por la motivación y el apoyo recibido a lo largo de estos años, su tenacidad y extensa experiencia son motivo de exaltación. Especial reconocimiento merece el interés mostrado por mi trabajo y las sugerencias recibidas del Doctor Orlando Acosta.

También deseo hacer extensiva mi gratitud a mis compañeros de Maestría y del Laboratorio de Biología Molecular de Virus por su amistad y colaboración. Un agradecimiento muy especial merece la comprensión, apoyo incondicional, paciencia y el ánimo recibidos de mi familia y amigos. A Miguel Ospino, por su colaboración en el suministro de materiales de laboratorio, Al Doctor Campo Elías Godoy por su apoyo en el tratamiento estadístico de la información y a Denniz Rodríguez por su ayuda incondicional en la adecuación de los Western.

A todos ellos, muchas gracias.

RESUMEN

La infectividad de rotavirus es reducida por moléculas que alteran el intercambio tiol-disulfuro y por anticuerpos contra PDI. El objetivo fue evaluar la interacción y asociación funcional entre PDI y TLPs de Rotavirus durante etapas tempranas de internalización del virus. PDI soluble, células integra o fracciones enriquecidas de membrana citoplasmática se incubaron con rotavirus en presencia o ausencia de agentes que bloquean el ambiente redox evaluando la interacción de PDI-rotavirus, PDI-proteínas virales y los cambios redox de las proteínas virales. Se evidenció interacción de PDI soluble y PDI de membrana con TLPs de rotavirus y con proteínas virales solubles. La interacción disminuye al tratamiento con agentes que bloquean el intercambio tiol-disulfuro. Incubar rotavirus con fracciones enriquecidas de membrana genera cambios en la distribución de tioles en las proteínas estructurales del virus VP7, VP6 y VP4. PDI interacciona con rotavirus y participa en los mecanismos redox que Rotavirus requiere para entrar a la célula.

Palabras clave: PDI de membrana celular, intercambio tiol-Disulfuro, TLPs de rotavirus, internalización viral

ABSTRACT

Rotavirus infection is interfered by thiol-disulfide exchange inhibitors and antibodies against PDI. The objective was to assess the physical and functional interactions between PDI and TLPs rotaviruses during the early steps of virus internalization. Accordingly, cells, cell membrane-enriched fractions or soluble PDI were incubated with rotavirus in the presence or absence of thiol-disulfide exchange inhibitors. PDI-rotavirus, PDI-isolated or recombinant viral proteins and redox changes in viral proteins were assessed. The evidence was shown for an interaction of soluble PDI or cell membrane-associated PDI with rotaviral soluble proteins or TLPs rotaviruses. These interactions were reduced with agents that block thiol-disulfide exchange. Incubation of rotavirus with cell membrane-enriched fractions affected the thiol-disulfide distribution in the structural rotavirus proteins VP4, VP6 and VP7. PDI interacts with rotavirus particles and participates in redox mechanisms that are used by rotaviruses during entry into their host cells.

Keywords: Cell surface membrane PDI, thiol-disulfide exchange, rotavirus TLPs, virus entry.

CONTENIDO

RESUMEN	4
LISTA DE DIAGRAMAS	9
LISTA DE FIGURAS	9
LISTA DE TABLAS	10
LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS	11
 CAPÍTULO 1	
1.1 INTRODUCCIÓN	13
1.2 MARCO CONCEPTUAL	15
1.2.1 La Proteína Disulfuro Isomerasa	15
1.2.1.1 La proteína disulfuro isomerasa-PDI, definición, fisiología y actividad	15
1.2.1.2 Propiedades estructurales y bioquímicas de PDI	16
1.2.1.3 Localización de PDI fuera del RE	21
1.2.1.4 PDI y el papel del intercambio tiol-disulfuro durante ciclo infeccioso viral	23
<i>1.2.1.4.1 Papel multifuncional de PDI en fisiología y fisiopatología</i>	23
<i>1.2.1.4.2 Fisiopatología del intercambio tiol-disulfuro y de la PDI en ciclos infecciosos</i>	24
1.2.2 Fármacos que afectan el sistema tiol-disulfuro	27
1.2.2.1 Ácido 5,5-dithio 2- nitrobenzólico (DTNB)	26
1.2.2.2 Bacitracina (Bac)	29
1.2.2.3 N-Acetyl-L-Cisteína (NAC)	31
1.2.2.4 N-etil-maleimido (NEM)	34
1.2.3 Ciclo Infeccioso De Rotavirus, Proteínas Virales Implicadas y sus Receptores Celulares Conocidos	36
1.2.3.1 Internalización de rotavirus durante el ciclo infeccioso	37
1.2.3.2 Proteínas Receptoras celulares de superficie asociadas a la internalización de rotavirus	44
<i>1.2.3.2.1 Proteína de choque térmico Hsc70</i>	44
<i>1.2.3.2.2 Integrinas</i>	45
<i>1.2.3.2.3 PDI y Intercambio tiol-disulfuro en el ciclo infeccioso de rotavirus</i>	47

CAPÍTULO 2	
2.1 ANTECEDENTES	50
2.2 JUSTIFICACIÓN	52
2.3 OBJETIVO GENERAL	53
2.4 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	53
 CAPÍTULO 3	
MATERIALES Y MÉTODOS	54
3.1 CONSIDERACIONES ÉTICAS, BIOSEGURIDAD Y RIESGO AMBIENTAL	54
3.2. ANIMALES Y LÍNEAS CELULARES	55
3.2.1 Línea celular MA104	55
3.2.2 Animales	55
<i>3.2.2.1 Vellosidades intestinales</i>	55
<i>3.2.2.2 Aislamiento de Fracciones enriquecidas de Membranas Celulares de Vellosidades Intestinales</i>	56
3.3 VIRUS Y PROTEINAS	56
3.3.1 TLPs de Rotavirus Cepas heterólogas (Humanos wt y RRV) y cepa Homóloga (ECwt)	56
<i>3.3.1.1 Purificación de TLPs rotavirales</i>	57
3.3.2 Proteínas virales: VP7, recombinantes VP5, VP6 y VP8 (rVP5, rVP6, y rVP8 respectivamente) y recombinantes PDI (rPDI)	57
<i>3.3.2.1 La proteína viral VP7</i>	57
<i>3.3.2.2 Las proteínas rVP5, rVP6, rVP8, rPDI (PDI recombinante)</i>	58
3.4 ANTICUERPOS Y REACTIVOS	58
3.5 INTERACCIÓN DE PDI Y ROTAVIRUS	60
3.5.1 Interacción de la proteína disulfuro isomerasa (PDI) con TLPs de rotavirus Humanos wt, ECwt y RRV y con las DLPs de ECwt y RRV	60
<i>3.5.1.2 ELISA de Captura</i>	61
<i>3.5.1.3 Inmunoprecipitación (IP) y western blot</i>	62
3.5.2 Interacción de la proteína disulfuro isomerasa recombinante (rPDI) con proteínas virales, TLPs o DLPs de rotavirus mediante ELISA	62

3.6 NATURALEZA DE LA INTERACCIÓN PDI-ROTAVIRUS	63
3.6.1 Modificación de la unión PDI-rotavirus	63
3.6.2 Detección de cambios oxido-reductores en las cisteínas del rotavirus	64
<i>3.6.2.1 Remoción de anticuerpos en membranas de PVDF</i>	65
3.6.3 Detección de sulfidrilo libres en TLPs de la cepa rotaviral Humanos wt	66
3.7 Análisis estadístico	66
 CAPÍTULO 4	
4.1 RESULTADOS Y ANÁLISIS	67
4.1.1 PDI y rotavirus se unen en vellosidades aisladas de ratón ICR adulto	67
4.1.2 PDI y rotavirus se unen en fracciones enriquecidas de membrana citoplasmática de vellosidades intestinales aisladas de ratón ICR adulto	68
4.1.3 PDI de vellosidades intestinales y de fracciones enriquecidas de membrana co-inmunoprecipita con TLPs de rotavirus	69
4.1.4 Anticuerpos anti-PDI inhiben la unión PDI-rotavirus en el modelo de fracciones enriquecidas de membrana citoplasmática aisladas de vellosidades intestinales extraídas de ratón ICR adulto	72
4.1.5 rPDI soluble se une a TLPs, DLPs y proteínas virales estructurales rVP5, rVP6 y VP7 de rotavirus en un sistema libre de células	73
4.1.6 Alterar el intercambio tiol-disulfuro disminuye la interacción PDI-rotavirus	75
4.1.7 La superficie celular reductora genera cambios en la distribución de tioles en las proteínas estructurales del virus	86
4.2 DISCUSIÓN	93
 CAPÍTULO 5	
CONCLUSIÓN	99
PROYECCIONES DE LA INVESTIGACIÓN	100
ANEXOS	101
ANEXO A. FIGURA 1B	101
ANEXO B. FIGURA 1C	102
ANEXO C. FIGURA 1D	103
ANEXO D. FIGURA 1E	104

ANEXO E. FIGURA 1F	105
ANEXO F. FIGURA 2A (SUPERIOR) Y 2B (INFERIOR)	106
ANEXO G. FIGURA 2C (SUPERIOR) Y 2D (INFERIOR)	107
ANEXO H. FIGURA 2E	108
ANEXO I. FIGURA 2F	109
ANEXO J. FIGURA 3A	110
ANEXO K. FIGURA 3B	111
ANEXO L. FIGURA 3C	112
ANEXO M. FIGURA 4A	113
ANEXO N. FIGURA 4B	114
ANEXO O. FIGURA 4C	115
ANEXO P. FIGURA 4D	116
REFERENCIAS	117

LISTA DE DIAGRAMAS

Diagrama 1. Representación esquemática de la molécula de la PDI	19
Diagrama 2. PDI y sus principales reacciones	21
Diagrama 3. Ácido 5,5-dithio 2- nitrobenzónico (DTNB)	29
Diagrama 4. Bacitracina (Bac)	31
Diagrama 5. Representación de la N-acetyl-L-cisteína (NAC) y del N-etil maleimido (NEM)	33
Diagrama 6. Estructura de una partícula viral de rotavirus RRV a pH 7.5 y su distribución electroforética	38
Diagrama 7. Secuencia de VP4	41

LISTA DE FIGURAS

Fig. 1. Unión PDI-TLPs de rotavirus en condiciones celulares	70
Fig. 2. Alteración del intercambio tiol-disulfuro previo o durante la unión PDI-rotavirus	79
Fig. 3. Unión e inhibición de la interacción PDI-rotavirus en sistema libre de células	88
Fig. 4. La superficie celular reductora genera cambios en la distribución de tioles en las proteínas estructurales del virus	90

LISTA DE TABLAS

Tabla A. Listado de anticuerpos y reactivos usados	59
Tabla 1. Resumen del tratamiento estadístico por t de student no pareada para los resultados de la figura 1B	68
Tabla 2. Resumen del tratamiento estadístico por t de student no pareada para los resultados de la figura 1C	71
Tabla 3. Resumen del tratamiento estadístico por t de student no pareada para los resultados de la figura 1F	73
Tabla 4. Resumen del tratamiento estadístico por t de student no pareada para los resultados de la figura 2A	76
Tabla 5. Resumen del tratamiento estadístico por t de student no pareada para los resultados de la figura 2B	77
Tabla 6. Resumen del tratamiento estadístico por t de student no pareada para los resultados de la figura 2C	78
Tabla 7. Resumen del tratamiento estadístico por t de student no pareada para los resultados de la figura 2D	81
Tabla 8. Porcentajes de inhibición de la unión PDI-rotavirus por acción de agentes que bloquean el estado redox	82
Tabla 9. Resumen del tratamiento estadístico por t de student no pareada para los resultados de la figura 2E	84
Tabla 10. Resumen del tratamiento estadístico por t de student no pareada para los resultados de la figura 2F	85
Tabla 11. Resumen del tratamiento estadístico por t de student no pareada para los resultados de la figura 3A	87
Tabla 12. Resumen del tratamiento estadístico por t de student no pareada para los resultados de la figura 3C	92

LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

Bac: Bacitracina
cCMP: Citocina monofosfato cíclica
cGMP: Guanosina Monofosfato Cíclica
DLP: Partícula viral de doble capa (*Double-Layered Particle*)
DTNB: Ácido 5, 5-dithio 2- nitrobenzóico
ECwt: **EDIM Cambridge Wild Type**; *EDIM*: Epidemic Diarrhea of Infant Mice
EDTA: Ácido Etilendiaminotetraacético
ELISA: Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
EPOC: Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica
ERp29: proteína 29 residente de RE
ERp57: proteína 57 residente de RE
ERp72: proteína 72 residente de RE
FIV: Virus de Inmunodeficiencia Felina
FRET: Fluorescencia de resonancia de energía de transferencia
GSH: Glutación reducido
GSSG: Glutación oxidado
HIV-1: Virus de Inmunodeficiencia Humana tipo 1
HIV-RT: transcriptasa reversa de HIV-1
hPDI: PDI humana
HPV-16: Virus de Papiloma Humano tipo 16
Hsc70: heat shock cognate protein 70
IL-8- IL-6: Interleuquinas 6 y 8
IP: Inmunoprecipitación
MA104: línea celular de riñón de mono verde africano
MLV: Virus de Leucemia Murina
MPB: Maleimido Biotinilado
NAC: N-Acetyl-L-Cisteína
NDV: Virus de la enfermedad Newcastle
NEM: N-Etil-Maleimido
NFκB: Factor Nuclear kappa B
NO: Oxido nítrico
pCMBS: Ácido p-cloromercuribenzoato sulfónico
PDI: Proteína Disulfuro Isomerasa
Py: Poliomavirus
RAFTs: Microdominios lipídicos

RBCs: Glóbulos Rojos
RE: Retículo Endoplásmico
RMN: Resonancia Magnética Nuclear
ROS: Especies Reactivas de Oxígeno
rPDI: PDI recombinante
RRV: cepas rotavirus simiana, mono Rhesus
RSV: Virus sincitial respiratorio
rVP5, rVP6 y rVP8: proteínas virales estructurales recombinantes
SPR: Resonancia de Plasmones de Superficie
SU: Glicoproteína70
SV40: Virus Simiano 40
T₃: Triiodotironina
TLP: Partícula viral de triple capa (Triple-Layered Particle)
TM: Proteína p15E
TNF α : Factor de Necrosis Tumoral α
VP: Proteína viral de rotavirus
WB: Western Blot
Ypdi: PDI de levadura
 β -ME (β -mercaptoetanol)

CAPÍTULO 1

1.1 INTRODUCCIÓN

Los rotavirus son la causa más frecuente de gastroenteritis severa en infantes menores de 5 años (Estes and Cohen 1989; Arias, Isa et al. 2002). La frecuencia de infección por rotavirus es muy similar a través del mundo, sin embargo, en los países en vía de desarrollo la infección por rotavirus es la principal causa de muerte en infantes. El mecanismo de entrada de los rotavirus a la célula hospedera parece estar compuesto por múltiples interacciones que ocurren entre las proteínas estructurales del virión y moléculas receptoras de la superficie celular del hospedero (Acosta, Calderon et al. 2009).

Los mecanismos de entrada de los virus a la célula se han constituido en un objeto central de investigación básica con amplias perspectivas de aplicación terapéutica. Se sabe que las células hospederas tienen la habilidad de hacer frente a la progresión y severidad de una infección en respuesta a diferentes tipos de patógenos, sin embargo, los patógenos también han desarrollado múltiples mecanismos para evadir o soportar la respuesta del hospedero. Dentro de los mecanismos generalmente utilizados está el uso de la maquinaria del hospedero para su internalización y replicación. Así, las actividades del hospedero responsables para esas interrupciones estructurales, son eje central de continuas y numerosas investigaciones que no siempre quedan esclarecidas.

La proteína disulfuro isomerasa (PDI), es una enzima thiol-disulfuro oxidoreductasa que cataliza la formación y clivaje de puentes disulfuro entre residuos de cisteínas de las proteínas y por tanto, media el intercambio redox asociado a múltiples actividades celulares. PDI, el intercambio thiol-disulfuro y su función chaperona se han relacionado en procesos de entrada de diversos virus como HIV-1, MLV, SV40, NDV, HPV-16 entre otros (Ryser, Levy et al. 1994; Mortola, Okuda et al. 1998; Gallina, Hanley et al. 2002; Markovic, Stantchev et al. 2004; Wallin, Ekstrom et al. 2004; Ishii, Kondo et al. 2007; Jain, McGinnes et al. 2007; Schelhaas, Malmstrom et al. 2007; Dickerhof, Kleffmann et al. 2011; Campos, Chapman et al. 2012; Reiser, Francois et al. 2012). La partícula viral interacciona con receptores celulares que facilitan su entrada, transporte, desensamblaje, replicación, ensamblaje y/o salida y tener éxito durante su proceso infeccioso. PDI es una molécula ampliamente distribuida a nivel celular, con concentraciones diferenciales que regula pasos de diversos procesos infecciosos y estudiar los principales aspectos de la PDI como

factor de virulencia es clave para dilucidar los mecanismos moleculares posiblemente universales de ciclos infecciosos (Stolf, Smyrniak et al. 2011).

En nuestro Laboratorio de Biología Molecular de Virus de la Facultad de Medicina, de la Universidad Nacional de Colombia, se ha demostrado que la integrina $\alpha\beta3$ y Hsc70 son co-receptoras de rotavirus durante su entrada y están asociadas en microdominios lipídicos, “RAFTs” en membrana citoplasmática de células de epitelio intestinal de cerdo, ratón y vaca (Guerrero and Moreno 2012; Santana, Guerrero et al. 2013). Igualmente se ha suministrado evidencia en cuanto a que la infectividad de rotavirus es significativamente reducida por diferentes moléculas que alteran el intercambio tiol-disulfuro y por anticuerpos contra PDI en varios modelos celulares (Calderón, Guzmán et al. 2012; Calderon, Guerrero et al. 2012). Sin embargo, no se ha esclarecido cual es el papel funcional de PDI que tiene lugar durante la unión PDI-rotavirus, es decir si PDI realiza actividades redox-isomerasa y/o chaperona sobre el virus o exclusivamente ejerce una de estas actividades como la chaperona y la actividad redox la realiza sobre proteínas celulares asociadas a la internalización del rotavirus como la integrina $\alpha\beta3$. En este trabajo se pretendió evaluar la interacción y asociación funcional de PDI-TLPs de rotavirus Humanos wt, ECwt y RRV durante etapas tempranas de internalización del virus en un modelo de vellosidades intestinales y de fracciones enriquecidas de membrana aisladas de vellosidades intestinales extraídas de ratón ICR adulto.

1.2 MARCO CONCEPTUAL

1.2.1 La Proteína Disulfuro Isomerasa

1.2.1.1 La proteína disulfuro isomerasa-PDI, definición, fisiología y actividad: En las células constantemente se presentan riesgo de malos plegamientos y agregación de cadenas polipeptídicas y de conformidad con la amplia diversidad de formas mal plegadas y de formas de plegamiento, los mecanismos y estrategias de control de calidad establecidas han evolucionado como mecanismo de compensación (Bukau, Weissman et al. 2006). La mayoría de las proteínas de la superficie celular y secretadas presentan puentes disulfuro, por ejemplo anticuerpos, receptores y canales de membrana plasmática, proteínas de matriz extracelular, hormonas, entre otros (Bulleid and Ellgaard 2011). Los puentes disulfuro potencian la estabilidad de las proteínas y regulan las funciones dependientes de oxido-reducción. Las chaperonas, ejemplo de ello la familia PDI, en general residentes de retículo endoplásmico (RE), son responsables de la maduración y el transporte de muchas proteínas secretoras mediante el uso de mecanismos de modificación pos-traduccional generalmente acoplados a reacciones de oxido reducción (Yao, Zhou et al. 1997).

La PDI es uno de los miembros de una familia de al menos 20 proteínas relacionadas, conocidas como familia PDI. Los miembros de esta familia son abundantes y desempeñan papeles significativos durante el folding de las proteínas nativas, en el control de calidad en un ambiente oxidativo rico en calcio del RE. Por ende una definición inclusiva para los miembros de esta familia es: *“proteínas que contienen dominios tipo tioredoxina tiol-reactivos y no tiol-reactivos con actividades tipo chaperona para el folding en RE y secreción de proteínas”* (Kozlov, Maattanen et al. 2010). La familia PDI tiene diversas funciones, que incluyen la formación y reducción de puentes disulfuro mediante mecanismos de oxido-reducción, así como actividad isomerasa y una actividad chaperona no covalente (Yao, Zhou et al. 1997). La proteína disulfuro isomerasa (PDI) EC 5.3.4.1¹ es una proteína de 55 kDa, ampliamente distribuida en eucarias y con homólogos procarias, que media la formación, re-arreglo ó eliminación de puentes disulfuro (Bassuk and Berg 1989; Hatahet and Ruddock 2009).

¹ http://www.brenda-enzymes.org/php/result_flat.php4?ecno=5.3.4.1

A nivel de ensayos *in vitro*, PDI estimula la reactivación de proteínas denaturadas y que contienen disulfuros reducidos como el caso de la insulina, lisozima, proteína de unión a riboflavina, etc (Yao, Zhou et al. 1997). En células eucariotas, PDI cataliza tanto la oxidación de cisteínas para formación de puentes disulfuro, como la reducción y reordenamiento de puentes disulfuro en las proteínas, dependiendo del potencial redox de la célula. Dependiendo de la particularidad, en condiciones *in vitro*, las actividades de PDI pueden ser interdependientes, así, durante el folding de proteínas, tanto la actividad isomerasa como la de chaperona son requeridas durante la reactivación de una proteína denaturada y con disulfuros reducidos. Sin embargo, sus actividades isomerasa y oxidoreductasa pueden ser independientes, de forma tal que la actividad isomerasa no sólo participa en la formación de disulfuros nativos, sino también, en prevenir entrecruzamientos durante el refolding reduciendo agregación (Yao, Zhou et al. 1997).

Dentro de los protocolos para evaluar *in vitro* las actividades de PDI chaperona, isomerasa y reductasa, se destacan el ensayo de denaturación de la Rhodanasa, el ensayo de la Rnasa A denaturada y reducida y el ensayo de reducción y precipitación de la cadena beta de la insulina respectivamente (Wang, Chen et al. 2010). El ensayo de denaturación de la Rhodanasa (enzima mitocondrial), se usa como indicador para medir la actividad chaperona, monitoreando la agregación durante el re-folding ó calentamiento por registro de dispersión de luz a 350 nm. En el ensayo de la Rnasa A denaturada y reducida en presencia de PDI a 25°C se determina la actividad Rnasa monitoreando el incremento de la absorbancia a 296 nm debido a la hidrólisis de cCMP, la pendiente del incremento lineal inicial de la actividad RNasa después del tiempo de retraso se toma como la medida de la actividad isomerasa de PDI. Por último, el ensayo de reducción y precipitación de la cadena beta de la insulina (que representa la dispersión de la luz de la forma reducida y precipitada de la cadena beta a 25°C y medida a 650 nm) permite evaluar la actividad reductasa que se calcula como la pendiente máxima de la curva (relativa al tiempo de retraso) (Wang, Chen et al. 2010).

1.2.1.2 Propiedades estructurales y bioquímicas de PDI: La reacción catalítica que resulta en la formación de un disulfuro implica un intercambio de disulfuro entre la PDI y el sustrato. Miembros de la familia PDI contienen cada uno al menos un dominio tioredoxina (Cys-x-x-Cys). A su vez, en cada sitio activo, un motivo CXXC puede encontrarse en dos estados (di-tiol y disulfuro), de forma tal que el transferir un disulfuro a una proteína sustrato resultará en la reducción de su sitio activo, el cual podrá ser re-oxidado por un robusto sistema acoplado a RE que incluye proteínas asociadas a formación de H₂O₂ a partir de oxígeno molecular durante sus procesos de oxido-reducción y un sistema de moléculas de bajo peso molecular, entre las que se destacan la relación de glutatión

reducido y glutatión oxidado (GSH/GSSG) para llevar a cabo la oxidación adicional (Bulleid and Ellgaard 2011). En estos dominios tipo tioredoxina, los motivos catalíticos CXXC se encuentran en el extremo N-terminal de una larga hélice α_2 y dentro del motivo catalítico, las dos cisteínas presentan papeles diferentes. La cisteína N-terminal, forma una mezcla heterodimérica con una proteína sustrato, mientras que la cisteína C-terminal está asociada con la liberación del sustrato. Al respecto, una glutamina posicionada abajo de la cisteína C-terminal funciona transfiriendo un protón durante la liberación del sustrato. Una arginina vecina modula el pKa de la cisteína catalítica por su ubicación en el sitio activo. Lo anterior sugiere que las interacciones coordinadas arginina-glutamina modulan la actividad catalítica de las proteínas disulfuro isomerasa (Kozlov, Maattanen et al. 2010).

PDI está formada por cuatro dominios tipo Tioredoxina dispuestos en una secuencia llamada *a-b-b'-x-a'* de los cuales tan sólo 2 dominios Tioredoxina (*a*, *a'*) presentan los motivos redox catalíticos: cisteína-glicina-histidina-cisteína (**CGHC**) independientes para realizar reacciones de intercambio tiol-disulfuro; los dominios *b* y *b'* carecen de motivos redox, pero presentan secuencias de residuos hidrofóbicos involucrados en reconocimiento y unión a sustrato. Resonancia Magnética Nuclear (RMN) de la estructura para el dominio PDI, mostró que las cisteínas en sus motivos CGHC (C37-G38-H39-C40) están en forma de tioles libres (Darby, Penka et al. 1998; Klappa, Ruddock et al. 1998; Pirneskoski, Klappa et al. 2004). Cada dominio tioredoxina está formado por la secuencia típica de α -hélices y hojas plegadas- β : β - α - β - α - β - α (Turano, Coppari et al. 2002). Adicional, presenta un corto interdominio entre *b'* y *a'* denominado región x-linker de 19 residuos y una región altamente ácida hacia el C-terminal (Dominio c) que está asociada a la unión a calcio y presenta el clásico motivo KDEL de retorno a RE (Turano, Coppari et al. 2002; Wang, Chen et al. 2010; Laurindo, Pescatore et al. 2012) (Diagrama 1A).

Estudios de cristalografía de la PDI de levadura (yPDI) (Presenta arquitectura similar a la PDI humana (hPDI) en su longitud completa a diferentes temperaturas (4 y 22°C) muestra una proteína altamente flexible, que puede ajustar su estructura para unirse a sustratos de variados tamaños y conformaciones de forma que permite la accesibilidad del sitio redox activo de PDI a los tioles críticos de los sustratos (Tian, Xiang et al. 2006; Tian, Kober et al. 2008; Laurindo, Pescatore et al. 2012) (Diagrama 1B).

En la estructura cristal de yPDI a 4°C, los cuatro dominios *a-b-b'-a'* están dispuestos en forma de “U”, una conformación más plegada en la que los dominios *a* y *a'* quedan de frente y la base de la “U” constituida por los dominios *b* y *b'* con una amplia superficie continua hidrofóbica formada al interior de la “U” (conocido como sitio de unión al sustrato), ya confirmado por estudios de RMN (Tian, Xiang et al. 2006). La otra estructura conformacional de la yPDI a 22°C, es una forma inducida más desplegada con una drástica

rotación del dominio a alrededor del loop entre a y b que impide quedar de frente con a' . Ya que el brazo a es más flexible que el brazo a' , entonces la región ab presenta mayor flexibilidad que la región $b'-x-$ a y dicha flexibilidad al parecer podría afectar la actividad de la enzima (Tian, Kober et al. 2008; Kozlov, Maattanen et al. 2010).

Estos cambios conformacionales implican una alta flexibilidad de PDI, que para la PDI humana (hPDI) es conferida por la región x-linker, que al actuar como “bisagra” permite mover su región C-terminal para adquirir cualquiera de las dos anteriores conformaciones (Wang, Chen et al. 2010; Laurindo, Pescatore et al. 2012). Análisis de fragmentos aislados $b'-x$ y $b-b'-x$ de hPDI muestran que el residuo 19 del x-linker parece adoptar al menos dos conformaciones una más cerrada que la otra, por interacción con el dominio hidrofóbico b' . En ese orden de ideas, la flexibilidad asimétrica de PDI en torno a su dominio b' proporciona eficiencia en la PDI al ser el principal sitio de unión a péptido ya que este dominio es crítico para la catálisis de isomerización mas no para las reacciones de oxidación en proteínas sustrato (Pirneskoski, Klappa et al. 2004; Barak, Neumann et al. 2009).

Estudios referentes a flexibilidad, movilidad inter-dominios y heterogeneidad conformacional para hPDI de longitud total, llevó a establecer que su región C-terminal (x-linker y a') es más sensible a la acción de proteasas que la región N-terminal, sugiriendo una heterogeneidad conformacional entre los dominios. Además, mutaciones puntuales (I272A y L343A) de la hPDI a pesar de presentar una aparente estructura secundaria “similar”, presentan diferencias significativas en cuanto a degradación por acción de proteasas y espectros de emisión de fluorescencia intrínseca que sugieren estados conformacionales diferenciales. Igualmente, esta movilidad de la región x-linker al sitio de unión al ligando (b') característica de la hPDI de longitud completa, sugiere que dicha movilidad está moderada por el dominio adyacente a' , lo que explicaría el diferencial de actividad de la enzima (Wang, Chen et al. 2010).

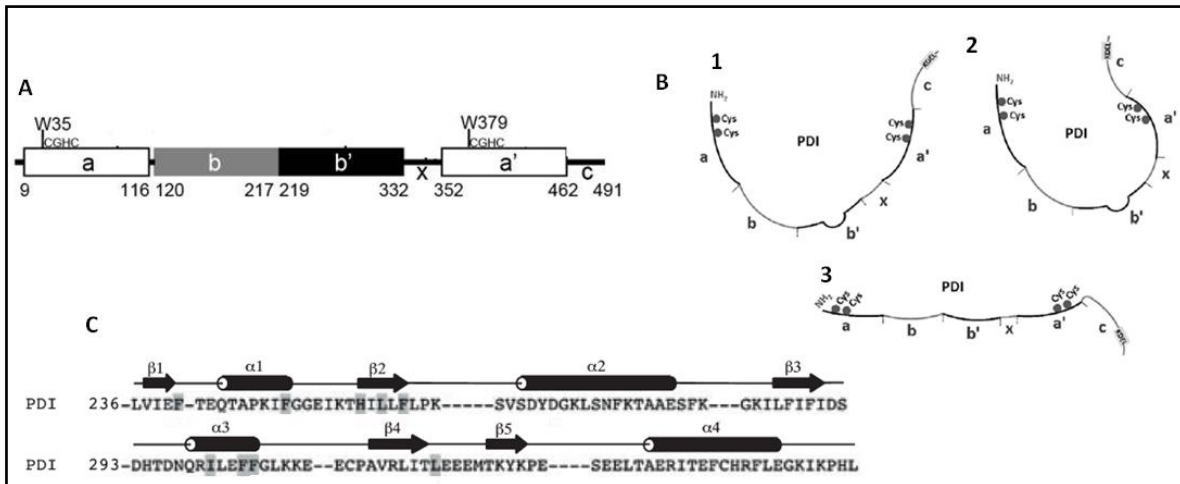


Diagrama 1. **A.** Representación esquemática de la molécula PDI. El diagrama muestra las posiciones de los dominios (a-b-b'-x-a'-c), los sitios activos secuencias **CGHC** (Turano, Coppari et al. 2002; Wang, Chen et al. 2010). **B. 1.** Estructura cristal de PDI de levadura a 4°C exhibe una estructura en forma de "U" con un centro hidrofóbico en la base de la "U" y los sitios redox frente uno del otro. **2.** PDI con su motivo redox del dominio a' reducido, con una configuración más cerrada, en la que la región x-linker, compite con la proteína sustrato no plegada por lo que su afinidad por el dominio b' se ve afectada; en contraste, la afinidad de este sitio por otras proteínas. **3.** Estructura cristal de la PDI de levadura a 22°C muestra una estructura más extendida tipo barco, con los dominios más rígidos uno al lado del otro, las implicaciones funcionales de esta conformación son desconocidas, podría ser un estado inactivo ó una adaptación a sustratos de distintos tamaño (Tian, Xiang et al. 2006; Tian, Kober et al. 2008; Wang, Chen et al. 2010; Laurindo, Pescatore et al. 2012). **C.** Estructura basada en la secuencia de alineamiento del dominio b' de la PDI humana. Los residuos potenciales involucrados en la unión de un sustrato están sombreados, el alineamiento incluye la parte N-terminal de la región x-linker (Kozlov, Maattanen et al. 2010).

El sitio de unión de PDI al sustrato, consiste en una extensa cavidad hidrofóbica entre las hélices $\alpha 1$ y $\alpha 3$, que incluye los residuos Phe223, Ala228, Phe232, Ile284, Phe287, Phe288, Leu303 y Met307. Se sabe que la región x-linker se pliega hacia atrás, se extiende y mimetiza la forma hidrofóbica para unirse al dominio b'. Específicamente las cadenas laterales que contiene los residuos de Leu343 y Trp347 (que hacen parte del x-linker), son insertados en la cavidad hidrofóbica del dominio b'. La superficie de unión parece ser conservada a través de las especies y en humanos, el fragmento b'a' de PDI es requerido para la eficiente unión a sustratos proteicos no -nativos (Kozlov, Maattanen et al. 2010) (Diagrama 1C).

En una proteína nativa, PDI cataliza repetidos ciclos de oxidación y de reducción de tioles con gran eficiencia, incrementando *in vitro* la introducción de disulfuros en proteínas de 100 hasta 6000 veces (Laurindo, Pescatore et al. 2012), lo que refleja sus actividades tiol oxidasa, reductasa e isomerasa, esta última involucrada en la translocación neta intra e intermolecular de puentes disulfuro en diferentes proteínas, un sello distintivo

característico de los miembros de la familia PDI (Diagrama 2). PDI también exhibe una actividad chaperona que no se asocia directamente a sus motivos CXXC, pero que se ve incrementada tras su oxidación, permitiendo a PDI el plegamiento de proteínas denaturadas por un mecanismo diferente a presencia de tioles o de puentes disulfuro, asociado con los dominios hidrofóbicos *b* y *b'* de PDI que carecen del motivo catalítico (Laurindo, Pescatore et al. 2012).

La interdependencia de actividades de PDI no ha sido esclarecida, aunque *in vitro* las actividades chaperona y tiol-oxido-reductasa son diferenciadas. Ya *in vivo*, el plegamiento redox al parecer requiere conjuntamente de las actividades chaperona e isomerasa, lo anterior debido a que se sabe que la actividad reductasa requiere de los cuatro dominios de la PDI. Según hipótesis, la actividad chaperona precede a la isomerasa, así la interacción de la PDI a su sustrato se da principalmente vía residuos hidrofóbicos expuestos (Laurindo, Pescatore et al. 2012) (Diagrama 2).

PDI se expresa en un rango de concentración en el lumen de RE que oscila entre 0.2-0.5 mM (Turano, Coppari et al. 2002; Laurindo, Pescatore et al. 2012). El modelo de mecanismo de reacción sugiere que la formación de nuevos puentes disulfuro por PDI en las proteínas nacientes, es una oxidación en la que el sustrato nucleofílico de cisteínas ataca el puente disulfuro de PDI, formando una mezcla PDI-sustrato disulfuro; el sustrato oxidado es luego liberado tras transferencia de sus equivalentes a PDI. Si el puente disulfuro se forma en la posición equivocada, la isomerización para su corrección es catalizada vía PDI por mecanismos que no han sido dilucidados, mecanismos que al parecer varían de acuerdo al sustrato. Se han observado *in vitro* dos mecanismos, el primero, basado en ciclos repetitivos de oxidación-reducción y el segundo, basado en reubicación intramolecular de enlaces disulfuro del sustrato, en el que se forma una mezcla disulfuro entre el sustrato mal plegado y PDI, finalizando con el intercambio molecular del disulfuro equivocado por el correcto (Laurindo, Pescatore et al. 2012).

Las velocidades *in vivo* de las reacciones catalizadas por PDI varían dependiendo del tipo de sustrato y del ratio glutatión reducido (GSH)/glutatión oxidado (GSSG). Muchas de las características estructurales de PDI afectan el pKa de sus tioles críticos y consecuentemente su reactividad, así, la cisteína nucleofílica del sitio redox de la PDI está desprotonada a pH fisiológico². El bajo pKa de esta cisteína N-terminal (cisteína de unión a sustrato) del motivo **WCGHC** resulta de interacciones con residuos adyacentes como la Histidina del dominio redox. La cisteína C-terminal esta menos expuesta o accesible y usualmente protonada, y su pKa es alrededor de 12,8 (Lappi, Lensink et al. 2004). Durante

² pKa 5,6±0,1 para la cisteína reactiva del sitio catalítico.

la oxidación del sustrato por PDI (primera etapa de isomerización), este pKa es probablemente inferior a 7, posiblemente mediado por cambios conformacionales relacionados con la Arginina 120 (Arg120) residuo conservado en la familia PDI, que desprotona la cisteína C-terminal y contribuye a la liberación de disulfuro mixto atrapado con el sustrato en la segunda etapa de isomerización (Hatahet and Ruddock 2009; Laurindo, Pescatore et al. 2012). Adicional al motivo CXXC y a la modulación de los valores de pKa de los sitios activos de las cisteínas, la eficiente realización del ciclo catalítico para oxidación o reducción requiere transferencia de numerosos protones tanto del catalizador como del sustrato catalizado y el ácido glutámico conservado en los miembros de la familia PDI se ha propuesto como aceptor de protones (Ellgaard and Ruddock 2005).

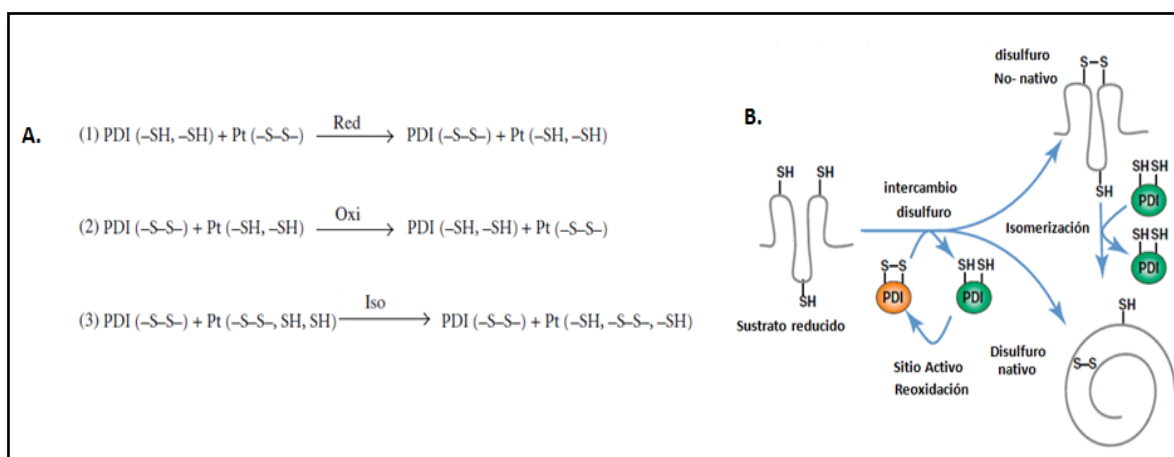


Diagrama 2. A. PDI y sus principales reacciones. Se esquematizan las reacciones de PDI: (1) reducción (Red), (2) oxidación (Oxi), (3) isomerización (Iso). Pt sustrato que contiene tioles (proteína/péptido) (Stolf, Smyrniak et al. 2011). B. Los miembros de la familia PDI con proteínas sustrato. Los pares de cisteínas en las nuevas proteínas sintetizadas entran al RE forman disulfuros previo a su interacción con proteínas residentes del RE como PDI para un intercambio tiol-disulfuro y posteriormente, las proteínas residentes deben ser re-oxidadas para iniciar un nuevo ciclo. Note que tanto disulfuros nativos como no nativos se pueden formar como resultado del intercambio tiol-disulfuro con un miembro de la familia PDI. Los disulfuros no nativos serán sujetos a isomerización, tras rondas de reducción y oxidación o por isomerización directa para formar un disulfuro nativo. (Es importante destacar que las reacciones que involucran cisteínas libres no están en estado protonado sino como aniones $-\text{SH}$ o tiolato). Miembros de la familia PDI reducidos, verde; miembros de la familia PDI oxidados, naranja; sustrato, gris (Bulleid and Ellgaard 2011).

1.2.1.3 Localización de PDI fuera del RE: De los miembros de la familia PDI, tres proteínas: PDI, ERp57 y ERp72 han sido encontradas en locaciones diferentes al RE entre los que se destacan núcleo, citosol y la superficie de membranas celulares y espacio extracelular (Essex, Chen et al. 1995; Fenouillet, Barbouche et al. 2001; Turano, Coppari et al. 2002) y aunque las tioredoxinas tienen distribución ubicua en la célula, algunas reacciones reductoras ocurren con mayor eficiencia con miembros de la familia de PDI, los

cuales a pesar de su similitud de sitios activos con las tioredoxinas, presentan una ventaja de interacción enzima-sustrato en la reducción de un puente disulfuro particular, esta ventaja explicaría por qué algunas reducciones específicas en la superficie celular son catalizadas por PDI y no por tioredoxinas aunque ambas estén presentes en la misma localización. Los grupos tiol de las proteínas de superficie celular están involucrados en adhesión celular, en algunos casos, la intervención directa de PDI se ha demostrado y en otros no ha sido esclarecida (Turano, Coppari et al. 2002).

La evidencia de esas diferentes localizaciones es aun controversial y más aun en la medida que presentan inusuales características de tipos celulares específicos y condiciones fisiológicas. Tampoco es claro como este pool extra-RE de PDI podría interrelacionarse con sus funciones RE canónicas. La búsqueda de evidencias respalda el rol de PDI en señalización celular y el papel de las chaperonas en la estabilización de complejos proteicos multi-subunidad. Existe evidencia de los roles de PDI, los cuales han sido ampliamente documentados en plaquetas, células endoteliales, linfocitos, células HeLa, neutrófilos entre otros. Con todo, PDI y otras chaperonas de RE pueden también ser secretadas al espacio extracelular en ausencia de lisis celular. En plaquetas, por ejemplo, PDI y Ero 1 parecen modular la función plaquetaria (Turano, Coppari et al. 2002; Laurindo, Pescatore et al. 2012).

La PDI de la superficie celular y la residente del RE son bioquímica e inmunológicamente idénticas y se sabe que cambios en la expresión de la PDI intracelular se ven reflejados en la PDI de superficie (Gallina, Hanley et al. 2002). En la superficie celular, esta enzima actúa predominantemente como una reductasa, llevando al clivaje de puentes disulfuro y por ende la producción de tioles libres en la proteína con la que interactúa (Gowthaman, Jayakanthan et al. 2008). Los ditiolos constituyen cerca del 25% de los tioles de la superficie celular, parecen ser mantenidos en estado preferencialmente reducido por PDI, lo que es consistente con el rol sugerido de reductasa en la superficie celular. Es muy probable que los tioles de los sitios redox de PDI y de al menos otra docena de proteínas tioles queden expuestos a la superficie celular (Turano, Coppari et al. 2002).

La PDI de la superficie celular es la principal catalizadora de reacciones de transnitrosación mediando internalización de óxido nítrico (NO) desde S-nitrosotioles extracelulares. De hecho la S-nitrosación de PDI inhibe su actividad isomerasa. Recientes investigaciones han vinculado la PDI de superficie celular en vías de señalización del óxido nítrico, se ha mostrado que proteínas extracelulares S-nitrosiladas pueden transferir NO al compartimiento citosólico mediante un proceso reductor de exportación del NO mediado por eventos reductores de la PDI. El NO formado por dicha reducción podría entrar en la

membrana, donde se presume que se oxida con el oxígeno molecular, y por lo tanto es capaz de nitrosilar tioles citosólicos. Mientras que algunas de las etapas de este proceso son todavía hipotéticas, la intervención de PDI ha sido bien documentada (Turano, Coppari et al. 2002; Laurindo, Pescatore et al. 2012).

Los mecanismos moleculares de cómo se ubica PDI en la membrana, cómo es secretada de las células y cómo PDI omite la secuencia de retención “KDEL” en RE están pobremente dilucidados. En hepatocitos, durante estos eventos se usan vías canónicas de secreción dependientes de calcio. Adicional, la secreción de la PDI desde RE también podría darse desde una ruta de fusión de vesículas de RE a membranas en un contexto de fragmentación del RE, este mecanismo ha sido propuesto para explicar la presencia de proteínas del RE en el fagosoma (Laurindo, Pescatore et al. 2012).

Existe evidencia que PDI se une débilmente a través de cargas electrostáticas a la membrana celular de hepatocitos de rata (Terada, Manchikalapudi et al. 1995). En fracciones subcelulares de cultivo primario de hepatocitos de rata se hizo la detección e identificación bioquímica de PDI de superficie celular y se estableció que PDI de la superficie celular parece interactuar con la superficie de membrana por interacciones electrostáticas, ya que se remueve PDI de las fracciones subcelulares al realizar lavados con carbonato (Terada, Manchikalapudi et al. 1995).

1.2.1.4 PDI y el papel del intercambio tiol-disulfuro durante ciclo infeccioso viral:

1.2.1.4.1 Papel multifuncional de PDI en fisiología y fisiopatología: “Las propiedades redox de PDI”. PDI esta robustamente presente en macropartículas derivadas desde endotelio a plaquetas, las cuales pueden contribuir en eventos relacionados a trombosis, apoptosis, o adhesión celular en sepsis (Laurindo, Pescatore et al. 2012). Además, PDI: i) interactúa con el receptor de la toxina de difteria para facilitar el transporte del fragmento tóxico hacia el citoplasma (Gallina, Hanley et al. 2002), ii) reduce un puente disulfuro en el ectodominio del receptor de la tirotrina (Couet, de Bernard et al. 1996) y iii) se une a la trombospondina extracelular (Huang, Detwiler et al. 1997) y NO en una transnitrosación (reacción requerida para el transporte de óxido nítrico en megacariocitos y para la maduración de plaquetas); la pérdida de la actividad isomerasa debido a S-nitrosación amplifica el daño neuronal en las enfermedades de Parkinson, Alzheimer, y esclerosis lateral amiotrófica (Gallina, Hanley et al. 2002).

La función reductasa de PDI de la superficie celular o extracelular ayuda a mantener la asimetría de fosfolípidos en membranas de células endoteliales, como un regulador negativo de la exposición externa de fosfatidilserina. La modulación redox de la PDI de superficie celular fuertemente afecta la agregación/adhesión, un efecto reportado por interacciones entre PDI e integrinas. Subunidades β de Integrinas muestran por fluorescencia de resonancia de energía de transferencia (FRET) y por resonancia de plasmones de superficie (SPR) interactuar físicamente con PDI, mientras el intercambio tiol-disulfuro estabiliza agregación plaquetaria mediada por las integrinas $\alpha 2\beta 1$ y $\alpha V\beta 3$ (Laurindo, Pescatore et al. 2012).

1.2.1.4.2 Fisiopatología del intercambio tiol-disulfuro y de la PDI en ciclos infecciosos: La importancia biológica total de la actividad de PDI de la superficie celular es actual objeto de estudio, sin embargo, se ha mostrado su participación en la reducción de puentes disulfuro de la toxina de difteria y en el caso de los virus, como el sindbis virus, virus de inmunodeficiencia humana tipo 1 (HIV-1), poliomavirus (Py), virus de la enfermedad del Newcastle (NDV), papiloma virus humano (HPV), virus de leucemia murina (MLV), entre otros, en los que la Infectividad viral parece depender de la actividad reductora de la superficie celular indicando que la PDI de superficie celular es requerida durante el proceso de entrada de diversos virus. La infectividad viral puede ser reducida por tratamientos físicos y químicos tales como el calor, radiaciones, procesos de oxidación, efectos de pH, solventes lipídicos y varios compuestos químicos. La velocidad de reducción depende de la cepa del virus, el tiempo de exposición, concentración viral, la naturaleza del medio de suspensión y las interacciones entre los tratamientos (Alexander, Manvell et al. 1997).

La infectividad viral también puede ser reducida al limitar la entrada del virus a la célula. Inhibidores del intercambio tiol-disulfuro impermeables a la membrana celular: DTNB (*Ácido 5,5-dithio 2- nitrobenzónico*), Bac (Bacitracina) y anticuerpos anti-PDI, previenen el clivaje de puentes disulfuro en la glicoproteína gp120 unida a receptor y por ende bloquean la entrada de HIV-1 (Gallina, Hanley et al. 2002). En el modelo de entrada del HIV-1 en sus células diana se requiere tres sucesivas interacciones virus-célula: i) la unión de la glicoproteína gp120 de envoltura de HIV-1 (Env) al receptor primario $CD4^+$, ii) el acoplamiento del complejo gp120- $CD4$ a los co-receptores CCR5 ó CXCR4 y iii) la activación fusogénica de la glicoproteína gp41 (Gallina, Hanley et al. 2002; Reiser, Francois et al. 2012). La entrada del HIV-1 es dependiente estrictamente de la reducción de puentes disulfuro de la glicoproteína de envoltura gp120 y el bloquear la reducción disminuye la entrada del virus en células linfoides, a pesar que la unión al receptor si ocurra, sugiriendo que la alteración en la fusión de membranas mediada por la proteína de envoltura de HIV-1 (Env) ocurre en una etapa pos-unión a la célula (Turano, Coppari et

al. 2002). El hecho que la actividad catalítica de la PDI presente en los linfocitos fuera requerida para la fusión soporta la hipótesis que la catálisis colabora en cambios conformacionales dentro de Env posterior a la unión a células CD4⁺ (Fenouillet, Barbouche et al. 2001; Gowthaman, Jayakanthan et al. 2008; Laurindo, Pescatore et al. 2012).

Diferentes investigaciones han aportado evidencia que PDI de la superficie celular de células H293 se asocia con el receptor CD4⁺ y a través de esta asociación, PDI alcanza a reducir puentes disulfuro de gp120 situados en la región que lo une a CD4⁺, facilitando así el proceso de internalización viral. La generación de tioles en gp120 y gp140 tras su unión a CD4⁺ en la superficie de células U937 y U87 (CD4 ±CCR5) es una sugerencia directa de reducción disulfuro (Gallina, Hanley et al. 2002; Reiser, Francois et al. 2012).

Por otro lado, la pre-incubación de líneas celulares con DTNB no inhibe la infectividad de HPV16, indicando que la modificación de los puentes disulfuro en la cápside no está involucrada en etapas tempranas de la infección, estos datos son consistentes con otros reportes, donde, agentes reductores como DTT y β-ME (β-mercaptoetanol), no inhiben la infección por HPV (Ishii, Kondo et al. 2007).

En el caso de poliomavirus (Py), se conoce que una red de la familia PDI conformada por PDI-ERp57 actúa coordinadamente y distintivamente con la proteína ERp29 para facilitar la infección. En condiciones in vitro, la proteína residente del RE, ERp29, promueve cambios conformacionales en el brazo C-terminal de la proteína viral 1 (VP1) en una reacción de remodelamiento dependiente del agente reductor DTT. Lo anterior podría implicar en cierto grado acción de otras isomerasas o reductasas residentes del RE. Al respecto y con el objetivo de asociar proteínas residentes del RE ERp57, PDI y ERp72 en el proceso de remodelamiento ó intercambio thiol-disulfuro de la VP1-PY mediado por ERp29 durante la entrada, transito a través del RE ó desensamblaje del virus, se estableció que la subregulación de las proteínas PDI, ERp57 y ERp72 se asocian con la disminución de la expresión de antígeno T de Py 48 horas pos-infección (48 h.p.i) en células NIH-3T3, lo que sugiere su implicación cooperativa en el proceso infeccioso. Con todo, usando pequeños RNAs de interferencia (siRNA) contra PDI en un modelo de células HeLa se previene que estas últimas sean infectadas por poliomavirus (Walczak and Tsai 2011).

Adicional, además, las proteínas recombinantes PDI, ERp57 y ERp72 al contacto con Py en un sistema no celular alteran la movilidad electroforética del VP1-Py lo que sugiere actividad catalítica por parte de las proteínas sobre el virus. Dicha movilidad no se altera al bloquear las cisteínas libres del Py y por inactivación con calor de PDI, ERp57 y ERp72. Por último la evidencia que la alquilación del Py reduce la expresión del antígeno T y por ende

la reducción de la infectividad viral, sugiere que las cisteínas libres de Py tienen papel indispensable durante el proceso infeccioso. Apparently se presentan actividades diferenciales de tipo isomerasa por parte de ERp57 y reductasa por parte de ERp72 y PDI sobre la partícula viral (Walczak and Tsai 2011).

El virus simiano 40 (SV40) (un virus de DNA sin envoltura que pertenece a la familia polyoma) usa una vía de entrada al huésped inusual y elaborada que cuenta con la participación de moléculas asociadas al RE. El desensamblaje y penetración del SV40 dependen del folding de proteínas del RE y de factores de control de calidad para entrar en las células huésped. En células CV-1 y HeLa se alteró la infección del SV40 en estadios tempranos utilizando un set de agentes químicos y de anticuerpos bloqueadores con el propósito de establecer el número de cisteínas en VP1 (proteína viral 1) de viriones intactos de SV40 que se encuentran formando puentes disulfuro y en forma tiol y se mostró que la proteína ERp57 (miembro de la familia PDI) colabora en el desensamblaje de VP1-SV40 durante su proceso de entrada (Schelhaas, Malmstrom et al. 2007).

En lo que refiere al MLV, la isomerización del puente disulfuro de la inter-subunidad en su proteína de Envoltura (Env) controla la fusión del retrovirus (Wallin, Ekstrom et al. 2004). La Env del MLV consiste en un complejo entre las proteínas gp70 (SU) y la proteína p15E (TM). SU contiene dos dominios: RBD en su N-terminal y C-term en su C-terminal, separados por una región conectora variable rica en prolina. TM contiene el péptido fusión, SU esta exclusivamente externa al virus y está conectada a la proteína TM a través de un puente disulfuro entre una de dos cisteínas en el motivo CXXC de su C-terminal y la última cisteína en el motivo CX₆CC de la TM (Wallin, Ekstrom et al. 2004). En el modelo, una Cys del "CXXC" de SU se une a una Cys de TM por puente disulfuro, la otra Cys de SU transportaría un tiol libre que podría inducir isomerización del complejo SU-TM en un disulfuro CXXC y disociación del complejo SU-TM. Así, en la cepa MO-MLV, SU-TM se encuentran unidos por un puente disulfuro, donde la cisteína libre no se encuentra expuesta, SU presenta un motivo CXXC con aparente actividad de isomerización. La exposición del tiol libre y posterior isomerización, libera SU del complejo y genera un nuevo tiol libre en TM, dicho evento estaría asociado a la variación en las concentraciones de Ca²⁺. modelos celulares y no celulares refuerzan esta evidencia, al parecer la modulación conformacional en la que participa Ca²⁺ potencia la isomerización, que a su vez afecta la fusión y como consecuencia la infectividad del MLV en los modelos analizados (Wallin, Ekstrom et al. 2004).

Para el NDV, era desconocido si el reordenamiento de puentes disulfuro tenía algún papel funcional en el anclaje y fusión mediado por las proteínas virales HN y F respectivamente

de este tipo de virus. Al analizar en un modelo de línea celular COS-7: los efectos de DTNB, Bac y anticuerpos anti-PDI en la viabilidad celular, la expresión de proteínas F y HN en la entrada del NVD en células COS-7, la presencia y alteración de tioles por inhibidores del intercambio tiol-disulfuro en HN y F sobre la infectividad, se mostró que el intercambio tiol-disulfuro es requerido para la fusión de membrana dirigida por la proteína de fusión del Virus de la enfermedad del Newcastle (Jain, McGinnes et al. 2007). Se han reportado tioles en la proteína de fusión (F) expresada en la superficie de la membrana de células COS-7 y que estos tioles libres son requeridos tanto para que NDV internalice, como también, durante el proceso de fusión célula-célula en células que expresan las glicoproteínas de NDV. Tras evaluar en un modelo glóbulos rojos (RBCs) el estado oxidado (sin tioles) de la proteína F en viriones y su relación con su activación por la proteína HN, se encontró que los cambios conformacionales sobre la proteína F, que se generan posterior al contacto con la superficie celular del huésped son producto de intercambio tiol-disulfuro con proteínas celulares que presentan actividad tiol-disulfuro oxidoreductasa o isomerasa como PDI (Jain, McGinnes et al. 2009).

1.2.2 Fármacos que afectan el sistema tiol-disulfuro

Los grupos sulfhidrilo de las enzimas poseen un alto grado de reactividad que se evidencia por su interacción con una amplia variedad de agentes. El conocimiento de este alto grado de reactividad también ha permitido su modificación química mediante el diseño de varios reactivos altamente selectivos y específicos que reaccionan rápida y estequiométricamente y pueden ser empleados mediante la selección cuidadosa de las condiciones de reacción para sólo modificar los grupos sulfhidrilo.

Así, la existencia de reactivos que presenten un amplio espectro de reactividades, permiten incrementar la especificidad de una reacción en particular o limitarla a uno o sólo algunos de grupos que sean accesibles. Sin embargo, la inhibición de la actividad de una enzima que requiera el sistema de intercambio tiol-disulfuro para su catálisis por parte de estos agentes químicos incluyen inhibición por inducción de alteraciones en la estructura terciaria de la proteína, que impida una conformación requerida para su actividad particular (Riordan and Vallee 1972).

Inhibidores y anticuerpos específicos de PDI, han sido usados para el descubrimiento de las funciones de otras proteínas tipo PDI, especialmente para ubicaciones de esta enzima fuera del RE (Hatahet and Ruddock 2009). Comúnmente como inhibidores de PDI se incluyen, ácido 5,5-dithio 2- nitrobenzónico (DTNB), bacitracina (Bac) y ácido p-cloromercuribenzoato sulfónico (pCMBS) y triiodotironina (T_3), que inactivan PDI por

unión covalente con el tiolato de la cisteína del sitio activo de la PDI. Por otro lado, partiendo de la importancia del intercambio y regulación del proceso tiol-disulfuro en la actividad de PDI, otros fármacos como N-acetyl-L-cisteína (NAC) y N-etil-maleimido (NEM) han sido empleados porque alteran dicho proceso, el NEM promoviendo enlaces tioeter con grupos SH libres y NAC alterando la relación GSH/GSSG (glutación reducido/glutación oxidado), promoviendo el transporte del NO (óxido nítrico) y reduciendo radicales libres tipo hidroxilo (Mandel, Ryser et al. 1993; Guthapfel, Gueguen et al. 1996; Campos, Chapman et al. 2012).

1.2.2.1 Ácido 5,5-dithio 2- nitrobenzónico (DTNB): conocido como reactivo de Ellman, usado generalmente en la determinación de grupos sulfidrilos. El disulfuro aromático reacciona con grupos tiol alifáticos para formar una mezcla disulfuro de la molécula proteica y una mol de 2-nitro-5-tiobenzoato por cada mol de grupo sulfidrilo de la proteína. El DTNB presenta muy baja absorbancia, pero cuando reacciona con grupos SH, el anión 2-nitro-5-tiobenzoato (TNB^{2-}) genera un intenso color amarillo que puede medirse a 412 nm³. El DTNB reacciona con la base conjugada (R—S-) de un grupo tiol libre. La velocidad de reacción depende del pH, del pKa' del grupo SH y de efectos estéricos y electrostáticos (Calderón 2010) (Diagrama 3A).

DTNB es un reactivo impermeable a membranas celulares comúnmente usado a modo de inhibidor de la PDI (Ishii, Kondo et al. 2007). Como ya se indicó, se ha reportado a DTNB como un fármaco con la propiedad de bloquear la generación de tioles libres en la glicoproteína gp120 y en una forma oxidada del motivo catalítico CXXC en PDI, impidiendo así la infección de HIV-1 (Gallina, Hanley et al. 2002). Se ha reportado que concentraciones del orden 1.0 mM causa 100% de inhibición sobre la actividad de la PDI soluble (Ryser, Levy et al. 1994; Gallina, Hanley et al. 2002; Lara, Ixtapan-Turrent et al. 2011).

Se han realizado estudios con agentes que inhiben la actividad de PDI, pero el modo exacto de unión del DTNB con el enzima PDI aún queda por esclarecer. Se sugiere que los puentes de hidrogeno son importantes durante la interacción entre DTNB (ligando) y PDI (enzima). Dentro del modelo, tanto el grupo SH de la Cys37 y un oxígeno del esqueleto de la Phe80 estarían formando puentes de hidrógeno con dos diferentes átomos de azufre del DTNB; al igual que el puente de hidrógeno entre un nitrógeno de la cadena lateral de la Arg 101 y el tercer oxígeno del DTNB. El DTNB puede también formar fuerzas de Van

³ http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Sigma/Product_Information_Sheet/d8130pis.pdf

der Walls con los residuos Ala34, Cys40, Trp36, His39 y Pro81. En general, la Cys 37 blanco del sitio activo de la PDI por su grupo SH, también es clave en la formación de puentes de hidrógeno con DTNB, lo que produciría una inhibición del DTNB por unión al sitio activo (Gowthaman, Jayakanthan et al. 2008) (Diagrama 3B).

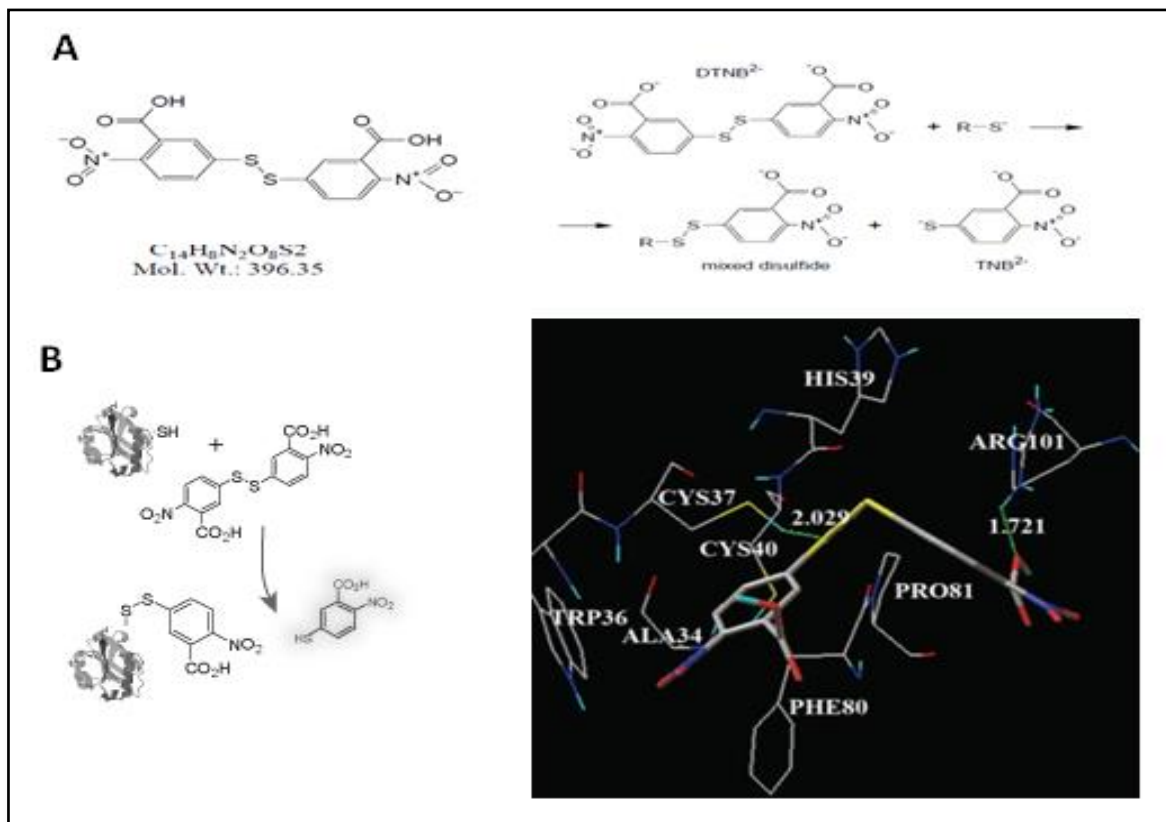


Diagrama 3. Ácido 5,5-dithio 2- nitrobenzónico (DTNB). A. Fórmula molecular, fórmula estructural y masa molecular (izquierda) y representación del mecanismo de reacción (derecha) del DTNB. B. Ilustración de la reacción del DTNB con una molécula proteica (izquierda)⁴ y representación bidimensional de la estructura y reacción del DTNB (derecha), modelo representativo de inhibición redox en la enzima PDI por DTNB. Las líneas de puntos verdes indican los puentes de hidrógeno. Se evidencian todos los residuos de aminoácidos de la PDI que participan en la interacción molecular al igual que los átomos involucrados (hidrógeno-cian, carbono-gris, oxígeno-rojo, nitrógeno-azul y azufre- amarillo) tanto de la enzima como de DTNB (Gowthaman, Jayakanthan et al. 2008).

1.2.2.2 Bacitracina (Bac): La bacitracina comercialmente disponible, es una mezcla de por lo menos 22 dodecametalopéptidos estructuralmente relacionados producidos por *Bacillus Subtilis* y *Bacillus Licheniformis*, de los cuales, Bac A es la más abundante (con cerca del 70%), y es la usada principalmente como un antibiótico frente a infecciones

⁴ <http://www.cellmosaic.com/bioassay-services/>

causadas por bacterias Gram-Positivas. Este antibiótico requiere unión a ión divalente Zn para su actividad biológica y se ha reportado que se une a otros metales de transición como Mn, Co, Ni y Cu. Estructuras cristalinas muestran que la molécula de Bac es más flexible y puede fácilmente adoptar configuración diferencial al interactuar con biomoléculas (Pfeffer, Hohne et al. 1991) (Diagrama 4A).

Bac ha sido ampliamente reportada desde 1981 como un inhibidor específico de la PDI en un amplio rango de estudios que incluyen entre otros, mecanismos de entrada de virus (Ryser, Levy et al. 1994; Markovic, Stantchev et al. 2004; Jain, McGinnes et al. 2007), adhesión de plaquetas (Essex and Li 1999), regulación de la actividad transcripcional de factor Kappa B¹², función reductora de membrana plasmática (Mandel, Ryser et al. 1993), entre otros (Markovic, Stantchev et al. 2004). Sin embargo, la evidencia *in vitro* de especificidad de acción del fármaco como inhibidor es escasa y aún menos acerca de su mecanismo de inhibición.

Se ha reportado: i) inhibición de la función reductora de la membrana plasmática en células de ovario de hámster Chino (CHO) por Bac (concentraciones del orden 1 a 10 mM) y por anticuerpos monoclonales RL77, RL90 y HP13 anti-PDI (concentración entre los 50 y los 200 µg/ml); ii) inhibición de la actividad en PDI aislada de ternera por agentes bloqueadores del intercambio tiol-disulfuro entre los que se destacan: Bac, DTNB; iii) inhibición por Bac del clivaje de un compuesto tiol radiactivo unido a membrana y iv) inhibición de la citotoxicidad de la toxina de difteria en células CHO tratadas previamente con Bac o con anticuerpos monoclonales anti-PDI (Mandel, Ryser et al. 1993).

El uso de concentraciones del orden de 1 mM de Bac tiene efectos parciales de inhibición sobre la actividad de PDI (medida como su capacidad reductasa, isomerasa ó chaperona en ensayos *in vitro*) (Karala and Ruddock 2010). Bajo sus condiciones experimentales, Bac no afectó las actividades isomerasa, chaperona u oxidante de la PDI, sin embargo, si lo hizo afectando directamente la actividad reductora de PDI durante el ensayo de precipitación de la cadena beta de insulina (arriba mencionada), aún en concentraciones del orden 0.1 mM (Karala and Ruddock 2010).

Se han sugerido dos mecanismos independientes de inhibición del fármaco: i) bacitracina compite por el sitio de unión a sustrato, especialmente al dominio b', modelo aceptado por Dickerhof et al., 2011 quienes purificaron las principales análogos de la Bac (A, B, H y

F) y establecieron sus correspondientes IC_{50} (Hatahet and Ruddock 2009)⁵. Además de dar evidencia de interacción directa entre Bac y PDI bovina, sugirieron la formación de puentes disulfuro entre el tiol del anillo tiazolina de la Bac y cisteínas 314 y 345 en el dominio de unión a sustrato de PDI (Dickerhof, Kleffmann et al. 2011). ii) la actividad de PDI podría ser inhibida por iones metálicos, a los cuales bacitracina se une. Estos iones metálicos podrían ser coordinados por las cisteínas del sitio activo de los dominios catalíticos de PDI.

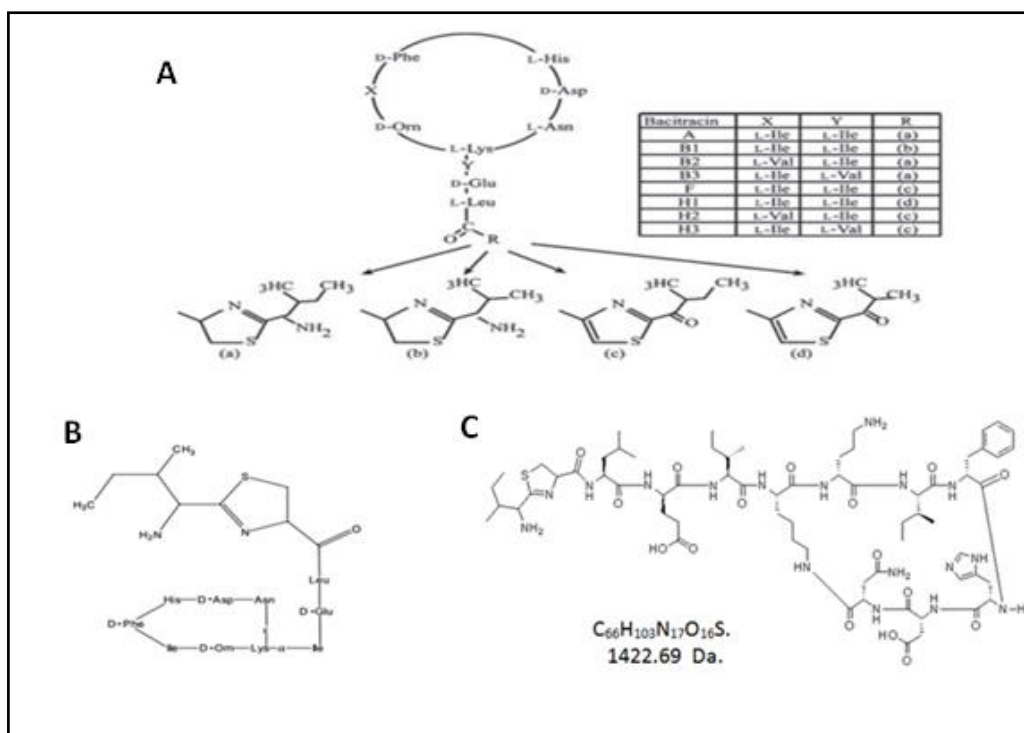


Diagrama 4. Bacitracina. A. Estructuras de los nueve más abundantes análogos de Bacitracina (Dickerhof, Kleffmann et al. 2011). El anillo amino-tiazolina [(a) y (b)] ó ceto-tiazol [(c) y (d)] en el N-terminal de bacitracina está formado por la condensación del grupo carbonil de la Ile ó Val (posición 1) con el grupo metil-thiol de la Cys (posición 2). La "R" indica diferentes formas en el N-terminal. (Ming and Epperson 2002) B. Bac A, Fórmula semiestructural (izquierda). C. Bac A, fórmula estructural (derecha) y masa molecular (derecha abajo)⁶.

1.2.2.3 N-Acetyl-L-Cisteína (NAC): la NAC es una variante acetilada de la L-Cisteína, usada actualmente a nivel clínico frente a sobredosis de acetaminofen (Brok, Buckley et al.

⁵ La habilidad de Bacitracina para inhibir el 50% de la actividad reductora de PDI bovina por ensayo turbidométrico, basado en la reducción de la insulina, se midió la velocidad de agregación de la misma por turbidimetría a 562 nm.

⁶ http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Sigma/Product_Information_Sheet/b0125pis.pdf

2006), prevención de exacerbación por enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) (Ardissino, Merlini et al. 1997), atenuación y prevención de Influenza en adultos mayores vulnerables (De Flora, Grassi et al. 1997; Lai, Ng et al. 2010), entre otros (Millea 2009) (Diagrama 5A izquierda). Estas aplicaciones clínicas provienen al parecer, de su capacidad de soportar los sistemas de óxido nítrico antioxidante del cuerpo durante el estrés, las infecciones, el asalto tóxico, y las enfermedades inflamatorias. La suplementación con NAC ha demostrado aumento en los niveles de glutatión (GSH), el principal antioxidante del cuerpo.

El glutatión es críticamente importante para la desintoxicación de una gran variedad de sustancias tóxicas, incluyendo xenobióticos, compuestos de peróxido, y otras moléculas generadores de radicales libres, de modo que GSH ejerce un profundo efecto protector sobre las células. El glutatión está compuesto de tres aminoácidos, glutamato, glicina y cisteína, esta última presenta concentración intracelular muy baja. Ya que a síntesis *de Novo* es el mecanismo principal por el cual el GSH se restablece, la disponibilidad de cisteína puede limitar la velocidad de síntesis de GSH en periodos de estrés oxidativo por ejemplo. Al corregir o prevenir el agotamiento de glutatión, NAC como precursor de glutatión, puede reducir la inflamación que se produce en condiciones tales como la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), la gripe, y la fibrosis pulmonar idiopática. Además, se ha encontrado que esta acción antioxidante de NAC actúa como vasodilatador facilitando la producción y la acción de óxido nítrico (Millea 2009; Dean, Giorlando et al. 2011). Adicional a los efectos anteriores, se ha demostrado que NAC también parece neutralizar oxidantes directamente, en particular la reducción del radical hidroxilo, $\cdot\text{OH}$ y ácido hipocloroso de forma tal que sus propiedades anti-inflamatorias están directamente vinculadas a vías oxidativas (Aruoma, Halliwell et al. 1989).

Cerca del 64% del EPOC es causado por infecciones respiratorias que involucran la influenza (cepas A y B) y virus sincitial respiratorio (RSV). Se ha demostrado que NAC en concentración de 10 mM inhibe la síntesis de mucina y mediadores pro-inflamatorios (IL-8, IL-6, $\text{TNF}\alpha$) en células de epitelio alveolar tipo II que fueron infectadas con RSV e influenza y reduce significativamente los títulos virales de estos virus. Esta actividad inhibitoria frente a la influenza A no es universal, sino que es dependiente de la cepa viral (Garigliany and Desmecht 2011; Mata, Morcillo et al. 2011; Mata, Sarrion et al. 2012).

La NAC potencia los efectos de la L-arginina en anti-agregación plaquetaria, puesto que la L-arginina promueve la síntesis endógena del óxido nítrico (NO) sirviendo como sustrato de la óxido nítrico sintasa (NOS). El efecto de NAC se asocia a la bioconversión de nitratos a óxido nítrico. NAC ejerce efectos anti-agregación plaquetaria a través de un incremento de la biodisponibilidad de NO el cual ejerce una potente inhibición en la función

plaquetaria vía activación de la guanilil ciclase soluble y por ende incremento en los niveles de guanosina monofosfato cíclica (cGMP) (Anfossi, Russo et al. 2001). Este estudio sugiere que los compuestos capaces de mantener la relación GSH / GSSG a los valores fisiológicos pueden ser útiles en el tratamiento de pacientes con la enfermedad de Crohn, reduciendo los niveles de la metaloproteinasas de matrix-2 y por ende mejorando la disfunción de la barrera epitelial (Romagnoli, Marcucci et al. 2012).

NAC también suprime la replicación de HIV de forma dosis-dependiente, además suprime la activación de NFkB, posiblemente interfiriendo en la fosforilación ó su transporte al núcleo. NAC al ser una eficiente fuente de tioles, previene la disminución en la concentración intracelular de cisteínas disponibles y bloquea la activación de NFkB, lo que conlleva a la supresión de la transcripción de genes bajo su control, entre los que incluye los genes regulados por este factor de transcripción, previniendo así, la activación del LTR de HIV-1. Estos hallazgos revelan un mecanismo de regulación genético previamente no reconocido en el que los niveles de tiol intracelular son cruciales en el control de la actividad de NF-KB y con ello influyen en el espectro de los genes expresados por las células estimuladas por citoquinas (Staal, Roederer et al. 1990; Liroy, Ho et al. 1993; Baba 2004).

La inhibición de la replicación viral en líneas celulares de fibroblastos felinos (Fel-039/CRFK) infectadas con el virus de inmunodeficiencia felina (FIV) y tratadas con concentraciones no tóxicas de NAC, mostró un aumento en los niveles de GSH intracelular, sugiriendo, que el efecto antioxidante con NAC restaura el nivel de GSH, efectivo al inhibir la replicación de FIV (Mortola, Okuda et al. 1998).

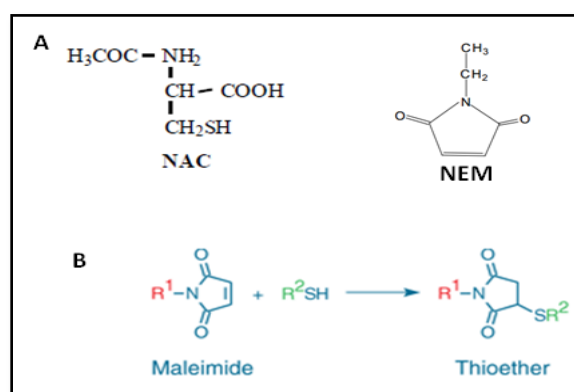


Diagrama 5. A. Representación de la N-acetyl-L-cisteína (NAC)⁷ (Izquierda) y del N-etil maleimido (NEM)⁸. (Derecha). (Baba 2004) B. Representación del mecanismo de reacción del NEM.

⁷ <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/a9165?lang=en®ion=CO>

NAC se proyecta como una herramienta farmacológica complementaria en el tratamiento de la diarrea aguda producto por la infección por rotavirus, se ha analizado la inhibición de infectividad viral de cepas RRV, Wa, Wi y M69 por NAC (en concentraciones que no afectan la viabilidad celular) observando una significativa reducción (90%) de la infección con respecto a células no tratadas y concomitante con un retorno en los niveles de expresión de las proteínas PDI y Hsc70 de superficie celular que se mostraban incrementados en células infectadas (Guerrero, Murillo et al. 2012). Vellosoidades intestinales aisladas de ratones lactantes ICR previamente infectados con la cepa ECwt y tratados con NAC también muestran un patrón similar de disminución de la infectividad viral y una reducción en los niveles de Hsc70 y PDI de membrana celular (Guerrero, Paula Pardo et al. 2013).

1.2.2.4 N-etil-maleimido (NEM): Es un compuesto orgánico derivado del ácido maleico, contiene un grupo funcional imida y un doble enlace que reacciona con grupos tiol para formar un tioéter, por lo anterior es comúnmente usado para modificar los residuos de cisteína de proteínas y péptidos. Maleimido no reacciona aparentemente con metionina, histidina o tirosina, y su reactividad con aminas es del orden de 1000 veces menor que con tioles requiriendo usualmente altos pH (Diagrama 5A derecha)(Riordan and Vallee 1972; Ong and Kerr 1995; Ikeda, Sagara et al. 2001; Kim, Kang et al. 2001; Gibon, Tu et al. 2010).

NEM ha recibido considerable atención, particularmente ya que el producto de su reacción es estable aun en condiciones de hidrólisis ácida. En general, sólo los grupos sulfidrilos más reactivos de las proteínas se combinan con compuestos que contienen un doble enlace activado para formar estables éteres de tiol; anhídrido maleico, ácido maleico, y especialmente NEM han demostrado ser particularmente útiles para este propósito. La formación de un derivado de alquilo estable que resiste la hidrólisis ácida es una característica importante de este reactivo, en particular cuando se contempla la verificación de la reacción por análisis de aminoácidos (Diagrama 5B).(Riordan and Vallee 1972)

Los factores que determinan la reactividad del grupo sulfidrilo incluyen la ubicación en la estructura tridimensional de la proteína, el medio ambiente microscópico y la interacción con otros grupos funcionales. Estas consideraciones son muy pertinentes para la interpretación de los cambios de actividad enzimática consiguientes a la reacción con reactivos de grupo sulfidrilo. Por lo tanto, puede ser necesario para determinar la

⁸ http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Sigma-Aldrich/Product_Information_Sheet/e1271pis.Par.0001.File.tmp/e1271pis.pdf

reactividad en condiciones de ensayo con una variedad de reactivos (Riordan and Vallee 1972).

Entre las aplicaciones de NEM en investigaciones biomédicas se cuentan: rol de especies reactivas de oxígeno en apoptosis mediada por NEM en células HepG2 (Kim, Kang et al. 2001), inhibición de NEM de la actividad catalítica de CF1 de *Dunaliella salina* por NEM (Selman-Reimer, Duhe et al. 1985).

NEM también ha sido usado en protocolos de inhibición viral, NEM [2mM-concentración no tóxica para la célula] inhibe el tráfico intracelular de pseudoviriones de papilomavirus humano tipo 16 (HPV-16) por unión a residuos de cisteínas de la principal proteína de la cápside L1. Así, la unión de NEM a los tioles de L1 de las HPV-16 en células HeLa genera cambios conformacionales en las pseudopartículas lo que resulta en la inhibición de la entrada y del posterior tráfico de las HPV-16 (Ishii, Kondo et al. 2007). Lo anterior se evidencia en la pérdida de infectividad de los pseudoviriones de HPV-16 al incubarlos con NEM. Los viriones tratados con NEM fueron capaces de unirse y entrar en las células HeLa, pero fueron degradados antes de llegar a la región perinuclear. En síntesis, la unión de NEM a los tioles de los viriones en HPV-16 causó cambios conformacionales que resultan en la inhibición de la entrada y el tráfico viral (Ishii, Kondo et al. 2007).

Algunos ensayos han mostrado que NEM [2-20 mM] inhibe la actividad de unión a DNA de la ICP8 (principal proteína de unión a DNA) del virus herpes simple tipo 1 (HSV-1). Los resultados sugieren que grupos SH libres estarían involucrados en la interacción o que NEM ocasiona cambios conformacionales en esa molécula que le impiden su interacción posterior (Ruyechan 1988).

Situación similar con la transcriptasa reversa de HIV-1 (HIV-RT), esta retrotranscriptasa es una enzima clave en el ciclo del HIV, responsable de la conversión de la hebra de RNA en la doble hebra de DNA viral. La enzima tiene dos funciones catalíticas diferenciadas, DNA polimerasa y actividad RNasa H (Loya, Gao et al. 1997). Al tratamiento de la HIV-RT con NEM mostró inhibición de su actividad. Se sabe que la Cys 280 de HIV-RT es diana de NEM. La evidencia citada de inhibición de HIV-RT, también se presenta con la transcriptasa reversa del virus de mieloblastosis aviar (AMV), donde NEM [0,3 mM], inhibe fuertemente la AMV-RT interfiriendo específicamente con el sitio de unión a templado de la enzima (Parnaik and Das 1981).

1.2.3 Ciclo Infeccioso De Rotavirus, Proteínas Virales Implicadas Y Sus Receptores Celulares Conocidos

Los rotavirus son la causa más frecuente de gastroenteritis severa en infantes menores de 5 años (Estes and Cohen 1989; Arias, Isa et al. 2002). La frecuencia de infección por rotavirus es muy similar alrededor del mundo, sin embargo, en los países en vía de desarrollo la infección por rotavirus es la principal causa de muerte en infantes. La gastroenteritis asociada a rotavirus cursa con diarrea severa, vómito, fiebre, deshidratación, desbalance electrolítico, y muerte si ésta no es tratada. Para 2004 la OMS estableció que 527000 niños y niñas mueren cada año por infecciones por rotavirus⁹.

Actualmente se cuenta con dos vacunas rotavirales, Rotarix, vacuna monovalente de origen humano, desarrollada por Glaxo Smith Kline (GSK), que usó el serotipo P1AG1 de mayor prevalencia mundial y RotaTeq, vacuna pentavalente de origen humano-bovino desarrollada por Merck Sharp & Dohme con especificidad contra cinco serotipos humanos, ambas disponibles internacionalmente y con eficiencias que oscilan entre el 74 y el 100% respectivamente (Tamayo and Moreno).

Los rotavirus pertenecen a la familia *reoviridae*. Dentro de las características morfológicas y genéticas de rotavirus se destacan: i) son virus de conformación icosaédrica trilaminar de 100 nm de diámetro que carecen de envoltura lipídica y cuyo genoma de RNA bicatenario está compuesto de 11 segmentos de RNA protegido por tres capas proteicas concéntricas (externa, intermedia e interna), conformadas por 6 proteínas estructurales conocidas como VPs; ii) la asignación genética basada en la cepa simiana SA11, está compuesta por seis genes virales (1, 2, 3, 4, 6, y 9) que codifican para las proteínas estructurales VP1, VP2, VP3, VP4, VP6 y VP7, y los cinco genes restantes (5, 7, 8, 10 y 11) codifican para seis proteínas no estructurales (NSPs), estas últimas no forman parte del virión, pero sí se sintetizan en la célula (enterocito) durante el ciclo replicativo del virus y por ende son una evidencia de replicación viral (Tamayo and Moreno ; Barreto 2010) (Diagrama 6B).

Los rotavirus presentan dos importantes especificidades antigénicas el *Grupo* y el *Serotipo*. El *Grupo* determinado por VP6 con características antigénicas permitiendo la clasificación en 7 grupos (A-G) que son indistinguibles al microscopio electrónico pero difieren antigénicamente por la técnica de ELISA. Los grupos de rotavirus A, B y C han sido encontrados en humanos y animales; los grupos D, E, F y G infectan solamente a los

⁹ OMS. <http://www.who.int/immunization/topics/rotavirus/en/index.html#>

animales. El grupo A es el más común y el de mayor importancia epidemiológica. El *serotipo* se determina mediante la tipificación serológica de VP7 que se conoce como serotipo “G” (glicoproteína), y el serotipo “P” (proteasa) con respecto a VP4. No obstante, la diversidad del rotavirus incluye más de 40 cepas según la combinación de estas dos proteínas de superficie. Se han determinado 14 serotipos G y 21 genotipos P, de los cuales 10 serotipos G y 7 genotipos P son humanos (Tamayo and Moreno ; Estes and Cohen 1989; Acosta, Calderon et al. 2009; Barreto 2010).

El núcleo, capa interna ó nucleocápside está formada por 60 dímeros de la proteína VP2 (masa molecular de 103 kDa) envolviendo el genoma viral dsRNA (-) y a las proteínas minoritarias VP1 (12 copias por virión), una RNA polimerasa dependiente de RNA y VP3 (guanilil-transferasa y metilasa). La capa intermedia, conocida como DLP, está constituida por 260 trímeros de la proteína VP6 (41kDa) y conecta el núcleo con la capa externa; las DLPs no son partículas infecciosas pero sí son transcripcionalmente activas. La capa externa está compuesta por las proteínas virales VP7 (37kDa) y VP4 (87kDa), que estructuran la partícula infecciosa de triple capa proteica ó TLPs. La glicoproteína VP7 forma 260 trímeros conformando una superficie lisa, mientras que VP4 se extiende hacia afuera con 60 estructuras diméricas en forma de espículas que sobresalen desde la superficie de VP7 aproximadamente 12 nm. Las proteínas VP7 y VP4 se han reportado como las principalmente involucradas en las interacciones del virus con la célula hospedera (Arias, Isa et al. 2002) (Diagrama 6A).

En la superficie de las TLPs se encuentran 132 canales acuosos que unen la nucleocápside con el medio externo, mediante los cuales la RNA polimerasa dependiente de RNA en conjunto con otras enzimas virales son expulsadas del núcleo y permiten la producción de transcritos. VP4 es proteolíticamente escindida para incrementar la infectividad viral y para la rápida internalización del virus, en dos subunidades, VP8 (28 kDa) y VP5 (60 kDa). La infectividad es facilitada al tratamiento con la proteasa tripsina que ejerce acción proteolítica sobre VP4, el clivaje por tripsina entre los residuos lisina y arginina posición 246 para cepas humanas y 247 para animales; las partículas virales nacientes (viriones) se forman en proximidad de RE y las partículas maduras son liberadas desde las células infectadas por lisis celular.

1.2.3.1 Internalización de rotavirus durante el ciclo infeccioso: La internalización de una partícula viral a la célula hospedera está sujeta a remodelamientos estructurales, durante este proceso, tanto proteínas virales como proteínas de la superficie celular son objeto de transformaciones moleculares que propician la internalización de la partícula viral a partir

del uso de receptores específicos, favoreciendo así la desestabilización de la estructura proteica viral y su acondicionamiento al contexto bioquímico de la célula. Identificar vías de entrada de los virus a la célula, permite comprender mecanismos de patogénesis y desarrollar estrategias terapéuticas de interferencia de la infección viral (Acosta, Calderon et al. 2009).

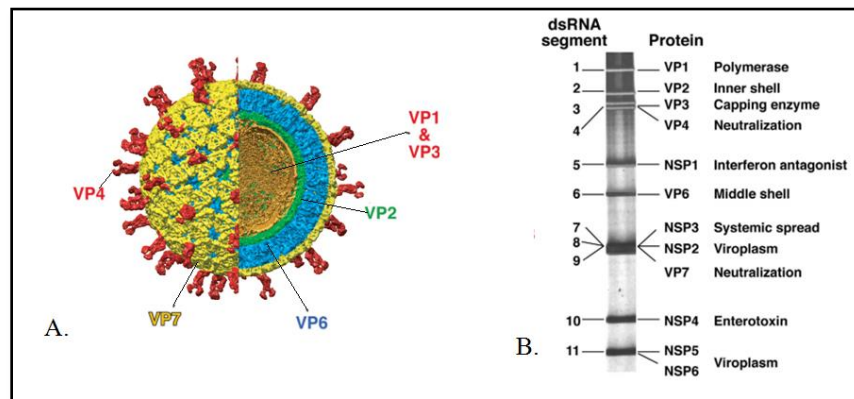


Diagrama 6. A. Estructura de una partícula viral de rotavirus RRV a pH 7.5. Reconstrucción representativa a partir de crio-microscopía electrónica de una imagen de 9,5 amstrong. Color rojo representa a la VP4, amarillo a VP7, azul la VP6, verde a VP2, café a el núcleo de RNA y complejo polimerasa. B. Distribución electroforética por SDS-PAGE de los 11 segmentos del genoma viral dsRNA. Cada gen codifica para una proteína viral, excepto Las proteínas no estructurales NSP5 y NSP6 que son codificadas por un fragmento de lectura de un solo segmento que se superpone (Pesavento, Crawford et al. 2005; Greenberg and Estes 2009; Li, Baker et al. 2009).

El ciclo viral supone diferentes etapas y en este escenario, el evento de internalización a la célula constituye una de ellas. Entre los modelos de entrada de virus al huésped se han descrito dos vías: endocítica que implica transporte en vesículas cubiertas por clatrina o a través de micropinocitosis y caveolas y la no-endocítica que implica fusión de membranas y se asocia a virus con cubierta lipídica (Acosta, Calderon et al. 2009; Mercer, Schelhaas et al. 2010).

La entrada de rotavirus supone un proceso endocítico caveola/“Rafts”-dependiente, caveolina/clatrina-independiente, dinamina-dependiente y sensible a depleción de colesterol (Acosta, Calderon et al. 2009; Gutierrez, Isa et al. 2010; Mercer, Schelhaas et al. 2010). Al comparar las características de entrada de 4 cepas rotavirales que presentaban diferencias en cuanto a requerimientos de receptor (las cepas Wa (humana), TFR-41 (porcina) y UK (Bovina) presentan un sistema de entrada endocítica mediada por clatrin y la cepa RRV simiana sensible a neuraminidasa y dependiente de integrina), se observó

que las cepas mencionadas comparten sus requerimientos por Hsc70 y dinamina y que se ven afectadas por depleción de colesterol. Las interacciones entre rotavirus y su huésped han sido ampliamente caracterizadas y discutidas para la cepa simiana RRV. Sin embargo, se ha propuesto que podrían presentarse particularidades entre las cepas rotavirales en cuanto al uso de receptores celulares, lo que abre la posibilidad de mecanismos particulares de entrada de rotavirus que dependen de las moléculas presentes y del orden de interacción, promoviendo vías endocíticas diferentes (Gutierrez, Isa et al. 2010). Sobre la evidencia disponible, se sugiere que la internalización de rotavirus bien sea por penetración directa de membrana o asistida, involucra dominios de las proteínas de la triple capa VP4 y VP7 (Mercer, Schelhaas et al. 2010).

Los rotavirus presentan un alto tropismo celular infectando únicamente enterocitos de la zona apical de las vellosidades intestinales lo que sugiere receptores específicos en esa zona (Estes and Cohen 1989; Acosta, Calderon et al. 2009; Greenberg and Estes 2009; Li, Baker et al. 2009; Barreto 2010). En resumen, rotavirus infectan principalmente enterocitos maduros en las vellosidades del intestino delgado, con propagación de la infección fuera del intestino hacia los nódulos linfáticos mesentéricos y tejidos periféricos. Ya *in vitro*, infectan a diferentes líneas celulares, en especial células epiteliales de origen renal, intestinal y hepático, entre ellas las Vero y MA104 de riñón de mono verde africano, y las Caco-2 de cáncer de colon humano. Estas líneas han sido los principales modelos celulares en la elucidación de los mecanismos de entrada, replicación e infección de rotavirus; sin embargo muchos de los eventos moleculares de entrada, ensamblaje y salida del rotavirus aún son objeto de investigación (Guerrero, Calderón et al. 2008).

En este escenario, el mecanismo de entrada de los rotavirus a la célula hospedera es un proceso multi-pasos, donde la partícula viral necesita interactuar con más de una molécula de la superficie celular para entrar a la célula. (Arias, Isa et al. 2002) Lo anterior, requiere la participación de varios dominios en múltiples interacciones que ocurren entre las proteínas estructurales del virión y moléculas receptoras de la superficie celular (Acosta, Calderon et al. 2009). El primer contacto del rotavirus con la superficie celular implica la participación de moléculas sensibles o resistentes a neuraminidasa, dependiendo de la cepa viral y de moléculas celulares receptoras como los gangliósidos GM1 y GM3, y la integrina $\alpha 2\beta 1$. Independientemente de la molécula utilizada para la unión inicial a la célula, los rotavirus después de interactuar con la integrina $\alpha 2\beta 1$ utilizan la integrina $\alpha v\beta 3$ y la proteína Hsc70 como receptores de post-unión, así como la integrina $\alpha x\beta 2$.

La proteína estructural viral VP4 es una proteína de 88 k-Da que determina el tropismo y especificidad serotipo de la cepa viral (Coulson, Londrigan et al. 1997). La penetración de la partícula viral posterior al anclaje del virus a la membrana celular es eficientemente incrementada por el tratamiento del virus con tripsina, que produce el clivaje de VP4 en los polipéptidos VP8 (28kDa) y VP5 (60kDa). Se sabe que esta escisión proteolítica no afecta la unión, sino que se asocia con la entrada del virus a la célula. Posiblemente este clivaje se asocie a remodelamientos conformacionales en esta proteína viral que favorezca la exposición de motivos dentro del contexto de reconocimiento e interacción con receptores celulares. A este respecto, se estableció que la infectividad de rotavirus incrementada por tripsina involucra una transformación conformacional de VP4 que altera la flexibilidad de la molécula (Pesavento, Crawford et al. 2005). Por criomicroscopía electrónica se conoce que las espículas de VP4 están presentes como 60 dímeros y que durante la proteólisis, ambos productos (VP8* y VP5*) permanecen asociados al virión (Chen, Settembre et al. 2009). VP4 presenta cambios conformacionales de transición desde un estado desordenado a otro más ordenado tras la tripsinización (Dormitzer, Greenberg et al. 2001; Pesavento, Crawford et al. 2005) (Diagrama 7).

La proteína VP4 es responsable de la unión inicial de rotavirus a la célula y también de los eventos post-unión que implican a la integrina $\alpha 2\beta 1$ y Hsc70, mientras que la VP7 interacciona con las integrinas $\alpha v\beta 3$ y $\alpha x\beta 2$ en una etapa de post-unión. El proceso de entrada de los virus a la célula hospedera finaliza con la penetración de la partícula viral al interior de la célula. Las cepas RRV, nar3, Wa y SA11 interaccionan con las integrinas $\alpha 4\beta 1$, $\alpha x\beta 2$ y $\alpha v\beta 3$ después de su unión a $\alpha 2\beta 1$ (Acosta, Calderon et al. 2009).

Ensayos usando anticuerpos monoclonales neutralizantes que reconocen VP5 de VP4 han permitido sugerir que la entrada celular está mediada principalmente por VP5. La penetración de rotavirus podría requerir un dominio hidrofóbico el cual reside en VP5 facilitando la penetración a través de la membrana celular en un paso posterior al anclaje. Kim et al., establecieron que partículas rotavirales con VP4 recombinantes a las que se les intercambió su dominio hidrofóbico de VP5* por uno hidrofílico eran 10000 veces menos infecciosas que las TLPs con una VP4 wt, indicando que el dominio hidrofóbico de VP5 es requerido durante la entrada de rotavirus a la célula (Kim, Trask et al. 2010). Es posible que los cambios conformacionales que experimenta VP4 en varios estados durante la entrada de la partícula viral a la célula enmascaren algunos epítopes y exponga otros que le permitan a la partícula viral interactuar de forma óptima con los diferentes receptores de las membranas celulares. El seguimiento de estos cambios conformacionales e identificación de los epítopes son claves para entender las bases moleculares de cómo

VP4 y sus sub-productos (VP5* y VP8*) interactúan con varios receptores durante la entrada del rotavirus (Pesavento, Crawford et al. 2005; Yoder, Trask et al. 2009).

Así, el contacto inicial en cepas rotavirales se da a través del dominio VP8 de VP4 con un receptor celular que contiene ácido siálico (GM1 y GM3). Esta interacción produce un cambio conformacional en VP4 permitiendo que el virus se una a un segundo receptor celular resistente a neuraminidasa (integrina $\alpha 2 \beta 1$) a través del motivo de unión DGE de VP5. En seguida, de una a tres diferentes interacciones se pueden llevar a cabo involucrando contactos entre VP5 (aminoácidos 642 a 659) y Hsc70, y VP7 y las integrinas $\alpha \nu \beta 3$ y $\alpha \nu \beta 2$. La interacción entre la Hsc70 y el virus como se discutirá más adelante depende del dominio de unión al péptido de la actividad de tipo ATPasa de estas proteínas chaperonas, regulando quizás cambios conformacionales sobre la partícula viral para promover la infección (Barreto 2010).

Se han caracterizado *in vitro* algunos posibles receptores celulares que median el tropismo del virus a las células blanco. En esta interacción las proteínas de la capa externa del rotavirus VP4 y VP7 establecen contactos con receptores celulares como ácido siálico, las integrina $\alpha 2 \beta 1$, $\alpha \nu \beta 2$, $\alpha \nu \beta 3$ y $\alpha 4 \beta 1$, y la proteína Hsc70. Las espículas de VP4 son susceptibles del “clivaje” proteolítico por tripsina, induciendo cambios conformacionales en la estructura de la espícula para exponer sitios claves en la interacción con co-receptores celulares (Greenberg and Estes 2009).

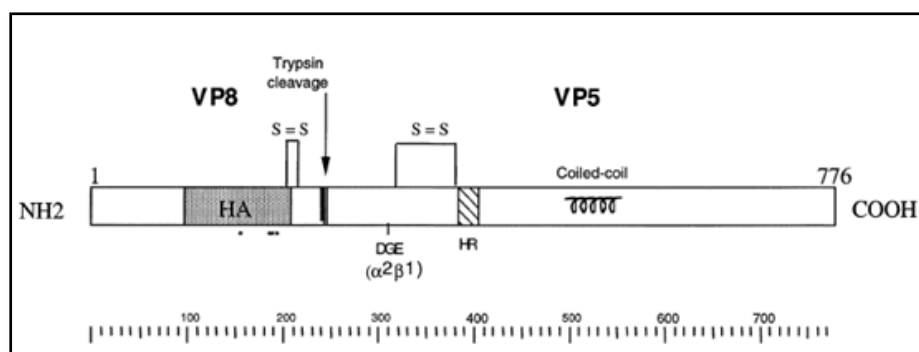


Diagrama 7. Secuencia de VP4. VP4 contiene 776 aminoácidos con dominios funcionales discretos entre los que se destacan: i) región sensible a tripsina en las posiciones de argininas 231, 241 y 248, generando polipéptidos VP8 (aminoácidos 1-231) y VP5 (aminoácidos 242-776); ii) dominio de interacción con ácido siálico asociado a los aminoácidos 93 y 208 de VP8; iii) motivo DGE de unión a integrina presente en VP5 (aminoácidos 308-310) relacionada a la unión de la variante nar3 a la integrina $\alpha 2 \beta 1$; iv) en la VP5 de RRV hay un puente disulfuro entre las cisteínas 318 y 380, y la Cys-267 presente en la cepa nar3 es capaz de formar un puente disulfuro alternativo con Cys-318; v) VP5 contiene un fragmento hidrofóbico entre los residuos 384 y 404 que forman secuencias análogas a dominios hidrofóbicos fusogénicos de la glicoproteína E1 del Sindbis Virus (Arias, Isa et al. 2002).

En el modelo propuesto de interacción, las cepas rotavirales se unen inicialmente a un receptor que contiene la unidad de ácido siálico (SA), para lo cual utilizan a VP8, este evento de unión inicial a SA puede ser omitido, como en el caso del mutante nar3, en el cual el dominio de unión a SA es substituido de un aminoácido (en este caso, el virus transitaría directamente a un segundo receptor representado por la integrina $\alpha 2\beta 1$). Las cepas rotavirales experimentan un cambio conformacional en VP4 como consecuencia de su interacción con SA a través del dominio VP8, lo que permite a la partícula viral interactuar con el segundo receptor: $\alpha 2\beta 1$ a través del dominio VP5 de VP4. Modelos derivados de estudios cristalográficos de un fragmento de VP5 permiten sugerir que el clivaje de VP4 con tripsina sería determinante en generar cambios conformacionales que capacitarían los productos (VP8 y VP5) de este clivaje para interactuar con sus respectivos receptores (Dormitzer, Greenberg et al. 2001; Acosta, Calderon et al. 2009) (Diagrama 7).

Según hipótesis, un evento propiciaría la dimerización de VP5*, lo cual sería seguido por la trimerización de VP5, la liberación de VP8 y el retro-plegamiento ("folding-back") de VP5. Estos reordenamientos conformacionales transicionales se asemejarían a los presentados en las proteínas de fusión de membrana de los virus con cubierta lipídica (Dormitzer, Greenberg et al. 2001; Dormitzer, Nason et al. 2004). A partir de estos estudios se ha sugerido que VP5 unida a la integrina $\alpha 2\beta 1$ podría adoptar un cambio conformacional asociado a su trimerización, proponiéndose la ocurrencia de cambios conformacionales y activación de esta integrina como requisitos previos a la unión de VP5 (Monnier, Higo-Moriguchi et al. 2006; Yoder and Dormitzer 2006; Yoder, Trask et al. 2009). A su vez, las integrinas $\alpha 2\beta 1$ y $\alpha v\beta 3$ son sustrato de la PDI de la superficie celular en el modelo de plaquetas y su activación implica generación de grupos tiol posiblemente claves en el reordenamiento conformacional de la partícula viral (Dormitzer, Nason et al. 2004; Yoder and Dormitzer 2006).

Las dos proteínas de la cápside externa (VP4 y VP7) poseen enlaces disulfuro. VP4 de cepas rotavirales humano, murino y RRV contienen cinco cisteínas en las posiciones 203, 216, 318, 380 y 774. En particular, en la cepa simiana RRV se han identificado dos enlaces disulfuro en VP4, uno en el dominio VP8* (Cys203-Cys216) y otro en el dominio VP5* (Cys318-Cys380) (Patton, Hua et al. 1993). La Cys-774 del carboxi-terminal de VP5* al parecer es blanco de prenilación (Patton, Hua et al. 1993). En variantes de RRV se han podido determinar tres mutaciones puntuales en VP4, una de las cuales corresponde al cambio Tyr-Cys en la posición 267. La implicación estructural de los puentes disulfuro posterior al clivaje con tripsina no ha sido esclarecida, pero la implicación de los puentes

disulfuro en la naturaleza funcional de las proteínas está implícita (Patton, Hua et al. 1993).

La VP7 humana, RRV presenta de manera conservada 8 cisteínas en forma de disulfuros (Cys82-Cys135; Cys165-Cys249; Cys191-Cys244; Cys196-Cys207) dilucidados por cristalografía de rayos X (Chen, Settembre et al. 2009). Estos puentes disulfuro juegan un importante papel estructural y funcional en esta proteína, tanto para su ensamblaje como desensamblaje durante y para su interacción con los receptores de la célula. La cepa rotaviral murina presenta una cisteína adicional en VP7 (Cys-47).

La VP7 requiere la obtención de un estado oxidado (formación de enlaces disulfuro) para constituir partículas virales viables, por ende, los enlaces disulfuro de VP7 contribuyen en la adecuada tridimensionalidad de dominios dependientes de conformación para la interacción con receptores tales como Hsc70 e Integrinas) (Acosta, Calderon et al. 2009). Al respecto, se ha demostrado que la disociación de los trímeros de VP7 es un paso esencial en la penetración de rotavirus en las células (Aoki, Settembre et al. 2009; Aoki, Trask et al. 2011). VP7 una vez glicosilada es oxidada al interior del RE por PDI en la formación de TLPs y se ha mostrado que la capacidad infecciosa del virus se ve afectada al interferir en la formación de los puentes disulfuro en la VP7 al bloquear el ensamblaje de la capa más externa del virión (Mirazimi and Svensson 1998).

Tres de los disulfuros (82-135, 165-249 y 191-244) están en regiones conformacionalmente no expuestas de la partícula viral; el enlace disulfuro formado por las cisteínas 196-207 ha sido caracterizado como un puente disulfuro de mayor exposición al solvente, esta disposición de enlaces disulfuro en VP7 la hace candidata a ser sustrato de PDI (Aoki, Settembre et al. 2009; Chen, Settembre et al. 2009).

La proteína VP6 (RRV, Humana y Murina) presenta tres cisteínas (96, 197, 331), 2001 se identificó su estructura tridimensional (para la cepa bovina RF) (Mathieu, Petitpas et al. 2001) y se ha sugerido la existencia de un puente disulfuro. Es posible que por accesibilidad a solvente la Cys-331 de VP6 sea el tiol libre dispuesto en VP6.

De los residuos de cisteínas presentes en VP4 (VP5*, VP8*), VP6 y VP7 de rotavirus sólo VP7 expone puentes disulfuro, de hecho, estudios de cristalografía han revelado que un residuo de cisteína de VP8 estaría expuesto a un ambiente hidrofílico. Caso contrario a las cisteínas de VP5 y VP6 que mostraron que estos residuos están expuestos en núcleos hidrofóbicos. Lo anterior permite sugerir que puentes disulfuro intramoleculares estarían accesibles al ambiente externo hidrofílico (Svensson, Dormitzer et al. 1994; Dormitzer,

Nason et al. 2004; Yoder and Dormitzer 2006; Yoder, Trask et al. 2009; Aoki, Trask et al. 2011; Calderón, Guzmán et al. 2012).

1.2.3.2 Proteínas Receptoras celulares de superficie asociadas a la internalización de rotavirus: Los actores y la secuencia de eventos a través de los cuales las proteínas de superficie celular generan cambios conformacionales sobre la particular rotaviral con su posterior internalización no están del todo dilucidados (Santana, Guerrero et al. 2013). Al caracterizar posibles receptores celulares, se ha evaluado en la línea celular MA104 el efecto de inhibidores metabólicos, depleción de colesterol de membrana y extracción de moléculas de superficie de membrana celular por detergentes, encontrando que: i) el tratamiento con tunicamicina (un inhibidor de la N-glicosilación) bloqueo en un 50% la infección por las cepas RRV y Nar3, ii) la depleción de colesterol con β -ciclodextrina bloqueo en un 90% la infectividad de las cepas RRV, Wa y Nar3, iii) el tratamiento con el detergente no iónico octil- β -glucósido (OG) redujo la infectividad en el 60% (Guerrero, Zarate et al. 2000). En cuanto a receptores celulares, utilizando anticuerpos dirigidos hacia la integrina $\alpha\beta 3$, al igual que ligandos de esta integrina, previo a la inoculación de cepas rotavirales RRV, Wa y Nar3 se observó una reducción de la infectividad de rotavirus en un paso posterior al anclaje, sugiriendo que estas cepas rotavirales interactúan con $\alpha\beta 3$ en un paso posterior a la unión del virus a la superficie celular (Arias, Isa et al. 2002).

1.2.3.2.1 Proteína de choque térmico Hsc70: La proteína Hsc70 (heat shock cognate protein 70) es la forma constitutiva de Hsp70, una familia de proteínas de distribución nuclear, citoplasmática y de superficie celular, inducidas por choque térmico, con una amplia función en plegamiento y desplegamientos de proteínas, traslocación, desagregación, ensamblaje y el desensamblaje de los complejos de las proteínas y en la señalización de choque térmico. La Hsc70 es una abundante proteína nuclear y citoplasmática miembro de la familia de chaperonas moleculares hsp70.

Específicamente, Hsc70 se ha detectado en la superficie de las células MA104, Caco-2 (Guerrero, Murillo et al. 2012) y recientemente en células de vellosidades intestinales aisladas de ratón ICR (Guerrero, Paula Pardo et al. 2013; Santana, Guerrero et al. 2013) y su implicación en el proceso de entrada de rotavirus se ha evidenciado mediante la inhibición de la infección producida por anticuerpos anti-Hsc70. Se ha demostrado que anticuerpos monoclonales anti-Hsc70 bloquean la infectividad de las cepas rotavirales RRV, Nar3 y Wa y que la incubación de estas cepas virales con una Hsc70 humana recombinante bloquea la infección. La Hsc70 interactúa con TLPs y DLPs de rotavirus, sin

embargo, la Hsc70 al encontrarse en células sensibles o no a infección por rotavirus, por sí sola no es responsable de la determinación de tropismo por el virus (Arias, Isa et al. 2002).

La interacción entre la partícula viral y la Hsc70 ocurre en un evento subsiguiente a la unión del virus a la célula y es un evento compartido por las cepas rotavirales sensibles y resistentes a la NA. La interacción entre el rotavirus y la Hsc70 implica las secuencias de aminoácidos de 531-554 y (642-658) de VP5 y 280-297 de VP6. Aunque Hsc70 interacciona con VP4 a través de los dominios antes citados, se piensa que el dominio hidrofóbico de VP5 (385-404) podría ser un sustrato potencial de la Hsc70. La interacción de Hsc70 con TLPs en solución parece producir cambios conformacionales en VP5 y VP7, de acuerdo con la modificación de las reactividades de estas proteínas a anticuerpos monoclonales, y por los efectos diferenciales de la temperatura y el pH sobre la infectividad (Acosta, Calderon et al. 2009). Las anteriores consideraciones conducen a formular la hipótesis de que la interacción post-unión del rotavirus con HSc70 facilitaría la generación de cambios conformacionales en VP5 que le permitirían asumir su forma trimérica desestabilizadora de la membrana celular o de la vesícula endocítica.

1.2.3.2.2 Integrinas: Las integrinas son una familia de proteínas celulares esenciales en la entrada de moléculas a la célula y son comúnmente usadas como receptores virales. Son glicoproteínas transmembranales α - β heterodiméricas, las principales receptoras que median la adherencia de las células a los componentes de la matriz extracelular tales como fibrinógeno, fibronectina y colágeno.

En la línea celular MA104 tratada con la cepa de rotavirus SA11 se observó una reducción de la infectividad viral previo al tratamiento de estas células con péptidos secuencia de reconocimiento integrina $\alpha 2\beta 1$ (DGE), $\alpha\beta 2$ (GPR), $\alpha 4\beta 1$ (LDV) ó con anticuerpos monoclonales anti- $\alpha 2\beta 1$ y anti- $\alpha 4\beta 1$, estableciendo que rotavirus contiene secuencias ligando y dominios tipo desintegrinas que están implicadas en la entrada a las células. (Coulson, Londrigan et al. 1997) Se sabe que las integrinas $\alpha 2\beta 1$ y $\alpha 4\beta 1$ median el anclaje de rotavirus SA11 en la célula huésped (Hewish, Takada et al. 2000).

Analizando 46 líneas celulares de especies y tejidos de órganos diferentes con respecto a 7 cepas de rotavirus caracterizadas en su momento como ácido siálico dependiente (SA11, OSU, RRV) o independiente (Wa, PA169, HAL1166, WC3) a diferentes multiplicidad de infección (MOI) y evaluando el efecto de la transfección de DLPs (RRV y WC3) en la infectividad de líneas celulares resistentes a la infección por rotavirus (como la línea celular de ovario de hámster chino-CHO) y el efecto del tratamiento con anticuerpos monoclonales (mAb) anti-subunidades $\alpha 2$ y $\beta 1$ sobre la infectividad de células CHO

transfectadas con subunidades de integrina $\alpha 2$ y β , se concluyó que la integrina $\alpha 2\beta 1$ promueve la entrada de rotavirus en las células pero no es necesaria para el proceso de anclaje (Ciarlet, Crawford et al. 2002). En otros ensayos, manteniendo la integridad de la unión ligando-integrina (lo que incluye manejo con cationes divalentes, mantener la asociación de subunidades α/β y preservar los puentes disulfuro) e inmunoprecipitación (IP) con proteínas biotiniladas de la superficie celular se logró identificar directamente las proteínas de superficie celular tipo integrina unidas a rotavirus SA11 usando un modelo de células CHO y MA104 transfectadas o no con subunidades tipo integrina, demostrando para el caso de la cepa RRV, la integrina $\alpha 2\beta 1$ requiere de su dominio $\alpha 2$ -I para unirse a rotavirus, situación que es facilitada por la subunidad homóloga $\beta 1$ (Londrigan, Graham et al. 2003).

Por otro lado, usando viriones adaptados en el laboratorio (con mutaciones puntuales en las proteínas VP4 y VP7) y evaluar la incidencia en el % de Infectividad de 10 diferentes cepas de rotavirus y sus recombinantes en células MA104, frente al tratamiento con anticuerpos monoclonales anti-integrinas $\alpha 2\beta 1$, $\alpha x\beta 2$ y $\alpha v\beta 3$, se estableció que : i) la secuencia DGE (secuencia putativa $\alpha 2\beta 1$ para colágeno tipo I) de VP5 es determinante de la especificidad de cepas de Rotavirus dependientes de integrina $\alpha 2\beta 1$, ii) los rotavirus se unen al dominio $\alpha 2$ -I de la $\alpha 2\beta 1$ vía secuencia DGE de VP4 y a las integrinas $\alpha x\beta 2$ y $\alpha v\beta 3$ vía VP7 durante la entrada del virus a la célula (Graham, Halasz et al. 2003; Graham, Takada et al. 2006). Mediante mapeo de toda la región dominio I de $\alpha 2$ de la integrina $\alpha 2\beta 1$ se han establecidos determinantes de la especificidad de las interacciones entre rotavirus y la integrina $\alpha 2\beta 1$ sugiriendo algunos residuos de aminoácidos involucrados en la unión de RRV y Wa a células CHO transfectadas con subunidades tipo integrina (Fleming, Graham et al. 2011).

El 87% de las cepas rotavirales animales, contienen el motivo secuencia DGE en la región 308 a 310 de VP5, adicional a los motivos LDV en la secuencia de aminoácidos que comprende 237 a 239 y la secuencia relacionada LDI entre 269 y 271 en VP7. Entre los aminoácidos 253 a 255 de VP7, todas las cepas rotavirales de mamíferos contienen la secuencia GPR, la cual, es un ligando para la integrina $\alpha x\beta 2$ en el dominio N-terminal de fibrinógeno (Hewish, Takada et al. 2000; Graham, Halasz et al. 2003).

Evaluar en el modelo de plaquetas la actividad de las integrinas ha permitido extrapolar posibles implicaciones funcionales de la interacción integrina-rotavirus. La integrina $\alpha IIb\beta 3$ específica de la superficie celular de plaquetas en ensayos libres de células posee actividad endógena tiol-isomerasa, una actividad asociada a las repeticiones CXXC de las cadenas $\beta 3$.

Esta actividad intrínseca tiol-isomerasa también se ha encontrado en la integrina $\alpha v\beta 3$, la cual comparte la subunidad común $\beta 3$. Las integrinas $\alpha IIb\beta 3$ y $\alpha 2\beta 1$ se han identificado como sustratos de PDI de la superficie celular y se ha demostrado que la exposición de células endoteliales a iones de Mn^{2+} induce la aparición de grupos tiol en la membrana celular, los cuales pueden ser encontrados en PDI y en la integrina $\alpha v\beta 3$, co-localizadas en la superficie de células endoteliales. *In vitro*, la exposición a este ion induce la formación de complejos estequiométricos de PDI/ $\alpha v\beta 3$ en la superficie de células endoteliales (Swiatkowska, Szymanski et al. 2008). Lo anterior, se observa en la aparición de grupos tiol en proteínas de superficie PDI y $\alpha v\beta 3$, las cuales co-localizan en la superficie celular, al parecer la formación del complejo PDI/ $\alpha v\beta 3$ induce conversión de la integrina a un estado de alta afinidad por unión a ligando. El uso de bloqueadores del intercambio tiol-disulfuro y anticuerpos anti-PDI en el modelo anterior, reducen tanto el complejo PDI/ $\alpha v\beta 3$ como la alta afinidad de unión a vitronectina por la integrina $\alpha v\beta 3$. Análisis de resonancia de plasmones de superficie mostró que la unión entre PDI y $\alpha v\beta 3$ inicialmente reversible se vuelve irreversible en presencia de Mn^{2+} , posiblemente por formación de puentes disulfuro entre los complejos estequiométricos. En conjunto los resultados obtenidos proponen un sistema de regulación de integrina $\alpha v\beta 3$ por PDI, codificado por la presencia de iones divalentes como el Mn^{2+} .

Al parecer, la actividad regulatoria de la PDI en el complejo con $\alpha v\beta 3$ induce la conversión de la integrina a su estado de alta afinidad competente para unir ligandos. Varias observaciones indican que la unión del ligando a integrinas induce cambios conformacionales asociados a intercambio de enlaces disulfuro dentro de la integrina (Acosta, Calderon et al. 2009). De hecho, el uso de anticuerpos anti-integrina $\alpha v\beta 3$, al igual que ligandos de esta integrina, previo a la inoculación de rotavirus cepas RRV, Nar3 y Wa, reducen la infectividad de RRV, Nar3 y Wa, pero no bloquea su anclaje a la célula, sugiriendo que estas cepas rotavirales interactúan con $\alpha v\beta 3$ en un paso posterior a la unión del virus a la superficie celular (Arias, Isa et al. 2002).

1.2.3.2.3 PDI y Intercambio tiol-disulfuro en el ciclo infeccioso de rotavirus: Las plaquetas humanas además de expresar en superficie la PDI, también expresan las integrinas $\alpha v\beta 3$ y $\alpha IIb\beta 3$, todas implicadas en agregación plaquetaria (Essex, Chen et al. 1995; Essex and Li 1999). De igual forma, integrinas y PDI se expresan en superficie de enterocitos, donde ya se observó interacción del rotavirus ECwt con integrina $\beta 3$ y PDI de las vellosidades aisladas del intestino delgado de ratón lactante ICR (Mayorga, Rubio et al. 2010). El aislamiento de estas proteínas permitió establecer por ELISA de captura y co-inmunoprecipitación la unión *in vitro* entre $\beta 3$, PDI y la cepa rotaviral ECwt. En forma particular, la interacción de PDI y $\alpha 3$ con las proteínas estructurales del rotavirus sugiere

la participación de reacciones de óxido-reducción que actuarían sobre los enlaces de disulfuro con la consecuente inducción de cambios conformacionales en las proteínas virales (Mayorga, Rubio et al. 2010).

La entrada de rotavirus a la célula hospedera está sujeta a la interacción de la partícula de triple capa (TLP) con receptores de la superficie celular ubicados en microdominios lipídicos-Rafts que median un remodelamiento de la estructura del virus facilitando su entrada. Análisis por co- inmunoprecipitación en fracciones de membrana celular tratadas con rotavirus ha mostrado que PDI se encuentra asociada en microdominios lipídicos “Rafts” con Hsc70 y integrina $\alpha\beta3$ Hsc70, y partículas rotavirales. Esta concurrencia o asociación en “Rafts” sugiere la posibilidad de la interacción física y específica (directa o indirecta) proteína-proteína entre las proteínas del virión y los receptores celulares, así como de éstos entre sí. De hecho, se ha reportado que algunas integrinas son sustrato de la PDI de la superficie celular. Ensayos de unión indican que la interferencia de la infección con inhibidores del intercambio tiol-disulfuro o con anticuerpos anti-PDI no afecta la unión de las partículas virales a la superficie celular, sugiriendo la participación de PDI (o de otra actividad enzimática similar) en un evento de post-unión durante la entrada del rotavirus (Calderón, Guzmán et al. 2012).

Reconocimiento de proteínas de superficie celular por biotilación y análisis por citometría de flujo e inmunofluorescencia han confirmado la presencia de PDI de superficie celular (Calderón 2010; Moreno 2010; Guerrero, Paula Pardo et al. 2013; Santana, Guerrero et al. 2013). Además, se ha reportado la inhibición de la infección rotaviral mediante el tratamiento previo de células MA104 con inhibidores impermeables a membrana del intercambio tiol-disulfuro Bac y DTNB. Estos fármacos al ser utilizados como inhibidores de PDI, han permitido sugerir la participación de PDI de la superficie celular en el proceso de entrada de los rotavirus. La especificidad del bloqueo de la infección con Bac y DTNB se confirmó con la adición de anticuerpos anti-PDI o de péptidos sintéticos correspondientes a VP4 y VP7 que contenían cisteínas en su secuencia, los cuales inhibieron significativamente la infección con rotavirus RRV (Calderón, Guerrero et al. 2011; Calderón, Guzmán et al. 2012; Calderon, Guerrero et al. 2012).

Al respecto, al caracterizar la secuencia de residuos aminoacídicos en las proteínas estructurales VP4 y VP7 de rotavirus que potencialmente median las interacciones sustrato-PDI de superficie celular se estableció un efecto inhibitorio en promedio de un 70% en dos secuencias de VP7 que presentaban cisteínas. A su vez, un péptido de VP4 redujo la infectividad cerca del 90 %, valor que no se dio al cambiar la cisteína por serina de este péptido. Los resultados mostrados sugieren que las cisteínas de estas proteínas

virales son importantes en la inhibición de la infectividad viral y de la interacción PDI-péptido, soportando la hipótesis que la PDI de la superficie celular en la línea celular MA104 puede contribuir a la entrada de rotavirus en un paso posterior al anclaje (Calderón, Guzmán et al. 2012). La especificidad de la inhibición de la infectividad de rotavirus por estos péptidos sugiere fuertemente que estas proteínas virales interactúan con moléculas receptoras celulares y que en esta interacción pueden estar implicadas las cisteínas durante un paso posterior al anclaje del virus. La inhibición de la infección producida por péptidos sintéticos derivados de rotavirus y su interacción con PDI podría explicarse en el modelo en el cual PDI funciona como co-receptor asistiendo la activación de integrinas las cuales interactuarían con las proteínas virales (Calderón, Guzmán et al. 2012).

La evaluación de la actividad disulfuro isomerasa de la superficie celular sobre el rotavirus durante los eventos iniciales del proceso infeccioso ha develado una interacción directa en un modelo acelular entre TLP-PDI y DLP-PDI. En las células tratadas con DTNB o Bac la infectividad se redujo en un 50% y el tratamiento con anticuerpos anti-PDI redujeron la infectividad en un 45% (Calderón 2010). En 2010 Moreno al incubó proteínas recombinantes rHsc70 y rPDI con concentraciones crecientes de un modelo acelular con proteínas virales recombinantes rVP5, rVP6 y rVP8, se estableció la interacción de VP5 y VP6 de rotavirus con PDI y Hsc70. Ya en el modelo de células MA104, se ha identificado la presencia de las proteínas celulares Hsc70 y PDI en Rafts lipídicos (Moreno 2010).

Por ELISA de captura y mediante un sistema de ultracentrifugación/SDS-PAGE/western blot se demostró la interacción de TLPs o DLPs de rotavirus RRV y ECwt con la PDI aislada de hígado bovino o la rPDI y, en un sistema celular, utilizando lisado de células MA104 después de la inoculación viral e incubación a diferentes tiempos (Couet, de Bernard et al. 1996; Calderón 2010; Calderón, Guerrero et al. 2011; Calderon, Guerrero et al. 2012). En un modelo de vellosidades intestinales usado para dilucidar los mecanismos moleculares de infección por rotavirus se confirmó la inhibición de la infectividad de rotavirus por DTNB y Bac, además de confirmar la presencia de PDI en membrana celular (Santana, Guerrero et al. 2013).

CAPÍTULO 2

2.1 ANTECEDENTES

Ensayos usando anticuerpos monoclonales neutralizantes que reconocen la proteína viral VP5 han permitido sugerir que la entrada celular esta mediada principalmente por esta proteína viral. (Pesavento, Crawford et al. 2005) Incubando las proteínas recombinantes Hsc70 y PDI con las proteínas virales recombinantes VP5, VP6 y VP8 mediante ensayos de ELISA indirecto e inmunoprecipitación se observó interacción en el modelo acelular. Igualmente, se identificó Hsc70 y PDI en Rafts lipídicos de células MA104 y mediante inmunoprecipitación (IP) se observó la interacción de las proteínas recombinantes estructurales del rotavirus VP5 – GST y VP6 con PDI y Hsc70 en el modelo acelular y en la línea celular MA104 (Moreno 2010).

En nuestro laboratorio mediante Inmunofluorescencia directa e indirecta, citometría de flujo y ensayos de marcaje de proteínas de membrana celular por biotinilación de proteínas de superficie y más recientemente por microscopia con focal se ha confirmado la presencia de PDI en la superficie de células MA104 y en vellosidades intestinales de ratón ICR (Calderón 2010; Gómez 2013; Guerrero, Paula Pardo et al. 2013; Santana, Guerrero et al. 2013).

En la línea celular MA104 (Calderón, Guerrero et al. 2011; Calderon, Guerrero et al. 2012) y en vellosidades intestinales aisladas (Santana, Guerrero et al. 2013) se reportó una inhibición de la infección rotaviral mediante el tratamiento previo celular con inhibidores del intercambio tiol-disulfuro Bac y DTNB (inhibidores de la familia PDI impermeables a membrana) sugiriendo la participación de la PDI de la superficie celular en el proceso de entrada de los rotavirus. Así mismo, se bloqueo la infección de rotavirus RRV al pre-incubar las células MA104 con anticuerpos anti-PDI o de péptidos sintéticos correspondientes a secuencias que incluían cisteínas de las proteínas virales VP4 y VP7 (Calderón, Guerrero et al. 2011; Calderon, Guerrero et al. 2012; Santana, Guerrero et al. 2013). Al incubar péptidos sintéticos de VP4 de RRV y VP7 de RRV y Wa con células MA104 y luego infectar con TLPs de rotavirus se evidenció que las secuencias que contienen cisteínas inhiben la infección entre el 70 y 90%. Al cambiar las cisteínas por serinas no se dio esa reducción de la infectividad sugiriendo que las cisteínas de estas proteínas virales son importantes en la inhibición de la infectividad viral y de la interacción PDI-péptido,

soportando la hipótesis que la PDI de la superficie celular de MA104 puede contribuir a la entrada de rotavirus en un paso posterior al anclaje (Calderón, Guzmán et al. 2012).

Adicionalmente, otro trabajo estableció por co-inmunoprecipitación que la PDI de la superficie celular de MA104 y de vellosidades intestinales de ratón ICR se encuentra asociada a microdominios lipídicos “Rafts” con las proteínas Hsc70 y $\alpha\text{v}\beta 3$ y que los rotavirus se unen a estas tres proteínas en estos microdominios lipídicos (Calderón, Guerrero et al. 2011; Guerrero and Moreno 2012; Santana, Guerrero et al. 2013). Se ha estudiado la interacción *in vitro* de la PDI aislada de hígado bovino y TLPs de rotavirus RRV y ECwt y la comparó con la observada en células MA104 y en las vellosidades intestinales de ratón (Calderón 2010; Calderón, Guerrero et al. 2011; Calderon, Guerrero et al. 2012). En estos estudios también se demostró *in vitro* la interacción directa entre PDI y TLPs, la cual se vio interferida por inhibidores de grupos tiol (Bac) (Acosta, Calderon et al. 2009).

Se ha utilizado el aminoácido modificado N-acetil cisteína (NAC) con capacidad reductora en cultivos de líneas celulares MA104 o Caco-2, luego de infectar estas células con las cepas rotavirales RRV, Wa, Wi o M69 y tratarlas con NAC se observó una reducción de la infección alrededor del 90% de la infección por rotavirus, sugiriendo a la NAC como una herramienta farmacológica en el tratamiento de rotavirus (Guerrero, Murillo et al. 2012). Análisis por inmunofluorescencia, ELISA de captura y Western Blot de la expresión de Hsc70 y PDI en células MA104 durante la infección por rotavirus RRV (2-16 h.p.i.) mostró un incremento en los niveles de estas proteínas celulares, mientras que la presencia de NAC 30 mM analizada a las 12 horas posterior a la infección (h.p.i.) disminuye la señal de antígeno viral detectado y reduce los niveles de expresión de las proteínas Hsc70 y PDI (Guerrero, Murillo et al. 2012). Se ha analizado la implicación de PDI durante la entrada de rotavirus ECwt en vellosidades intestinales aisladas de ratones lactantes ICR y BALB/c y se observó que el tratamiento de las vellosidades con anticuerpos anti-PDI o su correspondiente fracción F(ab')_2 antes de la inoculación de las cepas rotavirales ECwt, RRV o Wa reducía la infectividad entre un 50-100% dependiendo de la cepa rotaviral, estructura del anticuerpo y ensayo de detección usado. Resultados similares se obtuvieron al tratar las cepas virales con la PDI purificada previo a su inoculación en las vellosidades, además se demostró que la infección por rotavirus era sensible a DTNB y Bac (Santana, Guerrero et al. 2013).

2.2 JUSTIFICACIÓN

La PDI cataliza la formación y clivaje de puentes disulfuro entre residuos de cisteínas de las proteínas. Los puentes disulfuro son determinantes de la estructura terciaria y cuaternaria de las proteínas, lo que permite relacionar directamente a la PDI ó a otras proteínas con homología funcional, en procesos que requieran dichos cambios, por ejemplo, a nivel de receptores celulares o de sus ligandos (incluyendo micro-organismos), mediante cambios conformacionales que impliquen intercambio thiol-disulfuro.

Varias investigaciones han asociado los ciclos infecciosos a la PDI bien sea hospedera o la que expresan constitutivamente diversos tipos de patógenos eucariotas (Stolf, Smyrniak et al. 2011). Al respecto, se sabe que diversos virus como HIV-1, MLV, SV40, NDV, HPV-16 entre otros, utilizan la maquinaria celular que incluye a la PDI, para facilitar su entrada y tener éxito durante su proceso infeccioso (Gallina, Hanley et al. 2002; Wallin, Ekstrom et al. 2004; Ishii, Kondo et al. 2007; Jain, McGinnes et al. 2007; Schelhaas, Malmstrom et al. 2007; Reiser, Francois et al. 2012). Ya que durante la internalización, tanto proteínas virales como proteínas de la superficie celular son objeto de transformaciones moleculares que propician la internalización de la partícula viral a partir del uso de receptores específicos, favoreciendo así la desestabilización de la estructura proteica viral y su acondicionamiento al contexto bioquímico de la célula. Identificar vías de entrada de los virus a la célula, permite comprender mecanismos de patogénesis y desarrollar estrategias terapéuticas de interferencia de la infección viral (Acosta, Calderon et al. 2009).

En el laboratorio de Biología Molecular de Virus de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia, se evalúan los mecanismos moleculares que subyacen durante la internalización, determinando si durante esta etapa las proteínas virales estarían sujetas a remodelamientos estructurales. Resultados previos de nuestro laboratorio han mostrado que PDI está presente en la superficie celular de líneas celulares como MA104 y en vellosidades intestinales de ratón ICR (Calderón 2010; Gómez 2013; Santana, Guerrero et al. 2013), además, se ha logrado establecer que PDI se encuentra en microdominios lipídicos Rafts con otras moléculas ya caracterizadas como co-receptoras de rotavirus como la integrina $\alpha\beta3$ y Hsc70. Recientemente se estableció que bloqueadores del intercambio thiol-disulfuro impermeables a membrana tales como Bac y DTNB y anticuerpos contra PDI reducen la infectividad viral.

In vitro se estableció mediante ELISA e inmunoprecipitación la interacción entre la rPDI y las proteínas recombinantes VP5 y VP6; además por ultracentrifugación y posterior SDS-PAGE/western blot se demostró la unión entre la PDI y TLPs de rotavirus, fenómeno que se repitió bajo condiciones celulares en lisado total de células MA104 previamente infectadas con rotavirus y analizadas por ELISA de captura. Sin embargo, no se ha establecido claramente si el rotavirus requiere de cambios conformacionales, utilizando puentes disulfuro, en su interacción con los receptores celulares y para esto es necesaria la actividad tiol de PDI. Para intentar resolver esto, se usaron TLPs de Rotavirus Humanos wt, ECwt y RRV en un modelo de vellosidades intestinales de ratón adulto ICR y se buscó establecer la interacción entre PDI y TLPs de rotavirus ECwt, Humanos wt y RRV en eventos tempranos de internalización del virus, se comprobaron las condicionantes de la interacción PDI-rotavirus mediante el uso de agentes bloqueadores del intercambio tiol-disulfuro e inactivadores redox de la membrana celular.

2.3 OBJETIVO GENERAL

Evaluar la actividad oxido-reductora de PDI durante la unión PDI-TLPs de rotavirus en la membrana citoplasmática de vellosidades intestinales aisladas de ratón ICR adulto.

2.4 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar la unión entre PDI y TLPs de rotavirus (ECwt, RRV y los aislados humanos wt) en la membrana citoplasmática de vellosidades intestinales aisladas de Ratón ICR adulto.
2. Identificar cambios en la interacción rotavirus-célula al bloquear el intercambio tiol-disulfuro.
3. Establecer si durante la interacción rotavirus-célula el estado redox de la superficie celular modifica el patrón electroforético de la partícula rotaviral asociada a exposición de grupos sulfidrilos.

CAPÍTULO 3

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 CONSIDERACIONES ÉTICAS, BIOSEGURIDAD Y RIESGO AMBIENTAL

El presente trabajo no incluyó muestras de humanos, se emplearon virus adaptados en las condiciones de laboratorio ya referenciados y se usaron en total 30 ratones adultos ICR. Los productos derivados del manejo de estos ratones y de los diferentes tratamientos, fueron descartados en condiciones especiales después de realizar los experimentos, para protección del personal y del medio ambiente que lo rodea, evitando el posible contacto con otros humanos. Los restos de los animales fueron entregados a la universidad para su incineración, según los protocolos establecidos.

Los elementos cortopunzantes se recolectaron en contenedores rígidos de paredes imperforables (guardianes); las cajas de cultivo, pipetas, guantes y demás material de laboratorio, se recolectó en bolsas rojas de material biológico, según las indicaciones establecidas por el Ministerio de la Protección Social (resolución N° 008430 de 1993), para finalmente ser descartados por la empresa contratada por la Universidad Nacional para dicha actividad. Como producto de los ensayos realizados con rotavirus, se generaron puntas y microtubos contaminados. Estos productos se depositaron en recipientes que contenían hipoclorito, para inactivar el virus. Luego, se descartaron en recipientes de plástico de sellado hermético y posteriormente fueron entregados a la empresa contratada por la universidad para el manejo de residuos contaminados, dando a conocer a la empresa el tipo de residuos que se entregaba.

El desarrollo de la presente TESIS se realizó de acuerdo a la legislación vigente y otras normas reguladoras en materia de ética, experimentación humana, animal o de bioseguridad estipuladas en los siguientes documentos: Declaración de Helsinki de la asociación médica mundial, la cual contempla los principios éticos para las investigaciones médicas (1998); Manual de bioseguridad en el laboratorio de la Organización mundial de la Salud (WHO 2005); Las normas sobre el uso y cuidado de animales de laboratorio, establecido en la Resolución N°. 008430 de 1993 y Buenas Prácticas Clínicas (BPC).

3.2. ANIMALES Y LÍNEAS CELULARES

En la elaboración de este trabajo se manejaron tres modelos: la línea celular MA104 ampliamente caracterizada en investigaciones con rotavirus, vellosidades intestinales completas aisladas de ratón ICR adulto y fracciones de membranas citoplasmáticas extraídas de vellosidades intestinales de Ratón ICR adulto.

3.2.1 Línea celular MA104: (Línea celular de morfología epitelial y crecimiento adherente procedente de riñón de mono verde africano) fue cultivada en DMEM advance (Dubecco's modification of Eagles medium) (Gibco), suplementado con 2% (v/v) de suero fetal bovino (SFB) (Gibco). El subcultivo de la línea se realizó en cabina de flujo laminar y se incubó a 37°C con 5% de CO₂ (AutoFlow NU-4750 Water Jacket CO₂Incubator- NUAIRE).

3.2.2 Animales: Se obtuvieron ratones machos (*Mus musculus*) ICR adultos, cepa no consanguínea Crl: CD-1(ICR) BR (entre 3-4 semanas; 20-25 g), del Bioterio del Instituto Nacional de Salud (Bogotá Colombia). La procedencia de la cepa a utilizar, procede de los Laboratorios Charles River U.S.A. Es un modelo que en general, presenta una elevada variabilidad genética y es utilizado en investigaciones de oncología, toxicología e inmunología. La cepa se mantuvo en la unidad de producción, bajo status sanitario convencional, proporcionando condiciones controladas en el macro y microambiente, acorde al cumplimiento de los principios éticos relacionados con el empleo de animales de experimentación y los requerimientos de salud y bienestar animal, aspectos citados anteriormente.

3.2.2.1 Vellosidades intestinales: Se realizó extracción de vellosidades de acuerdo al protocolo establecido en el laboratorio (Guerrero, Santana et al. 2010). Ratones ICR adultos, se sacrificaron por dislocación cerebro-cervical y se removió inmediatamente su intestino delgado. Se lavó el lumen intestinal usando jeringas de 5 mL, primero, con MEM a 4°C (Minimum Essential Medium Eagle) (SIGMA) que contenía una solución de antibióticos y antimicóticos (100 U/ml de penicilina, 100 µg/mL de estreptomina y 0.25 µg/mL de anfotericina B (Invitrogen)) y posteriormente con MEM a 4°C que contenía 1.5 mM EDTA (Ácido Etilendiaminotetraacético) (SIGMA), se abrió longitudinalmente y se cortó en segmentos de aproximadamente 5 mm. El material se dispuso en cajas de Petri con 7mL de solución MEM-EDTA-antibiótico-antimicótico a 4°C. Los fragmentos suspendidos en el medio que contiene EDTA, fueron incubados en tubos de centrifuga de 15 mL por 15 min a 37°C en un agitador rotatorio (roto-Torque modelo RT50 (Cole-Palmer)) a 4.47 g (200 rpm). Luego se transfirieron a una caja de Petri a través de una

mallla metálica estéril (de 1mm² de poro), utilizando puntas estériles, previamente cortadas para ampliar su diámetro (aproximadamente 2 mm), hacia una caja de Petri. El material retenido en el filtro, fue nuevamente incubado y centrifugado con medio MEM-EDTA-antibióticos bajo las condiciones arriba mencionadas y este procedimiento se repitió 4 veces. El contenido celular dispuesto en la caja de Petri se centrifugó a 40 g por 5 min a temperatura ambiente, se descartó el sobrenadante y el precipitado se lavó tres veces con 5 ml de MEM que contenía antibiótico a 4°C para retirar el EDTA. Estas fracciones enriquecidas con vellosidades intestinales se almacenaron a 4°C en medio MEM-antibióticos hasta su uso en un tiempo máximo de 2 horas.

3.2.2.2 Aislamiento de Fracciones enriquecidas de Membranas Celulares de Vellosidades Intestinales: se obtuvieron fracciones enriquecidas de membrana citoplasmática a partir de vellosidades intestinales aisladas para evaluar la interacción PDI-rotavirus (Lin, Selinfreund et al. 1987). Brevemente, a las vellosidades intestinales extraídas de ratón ICR adulto se le adicionó buffer de homogenizado hipotónico que contenía [(1:30 (p/v), sacarosa 50mM (MERCK); HEPES 5mM (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid) pH 7.4 (CALBIOCHEM), se homogenizó por 15 minutos en un homogenizador manual de vidrio (Tenbroeck, 40 ml), a 5 minutos de iniciado el procedimiento se adicionó CaCl₂ (a concentración final 10 mM). Para sedimentar los agregados de membranas producidos por el catión calcio, se centrifugó durante 5 min a 3440 g y a 4°C (Beckman J2MC con rotor de ángulo fijo JA-17). Se descartó el pellet y centrifugó el sobrenadante por 30 min a 19800 g y a 4°C. El sobrenadante fue descartado y el pellet (fracción de membranas celulares aisladas) fue resuspendido en PBS estéril y se mantuvo a 4°C con azida de sodio 0,02 % (p/v) hasta su uso.

3.3 VIRUS Y PROTEINAS.

3.3.1 TLPs de Rotavirus Cepas heterólogas (Humanos wt y RRV) y cepa Homóloga (ECwt): Para evaluar la interacción de PDI-rotavirus se emplearon TLPs (Triple-Layered Particles) de tres cepas rotavirales etiquetadas como ECwt (cepa homóloga: EDIM Cambridge Wild Type; EDIM: Epidemic Diarrhea of Infant Mice, donada por M. Franco (Instituto de Genética de la Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia), Humanos wt (aislados por el director del proyecto a partir de diarreas de niños bogotanos) y RRV (cepas heteróloga: cepa de rotavirus simiana, mono *Rhesus*, donadas por el Doctor Carlos Arias, UNAM, México). Igualmente se usaron DLPs (Double-Layered Particles) de las cepas RRV y ECwt.

3.3.1.1 Purificación de TLPs rotavirales: se obtuvieron según protocolos previos (Espejo, Lopez et al. 1981; Gualtero, Guzman et al. 2007; Guerrero, Santana et al. 2010). Brevemente, los homogenizados intestinales (cultivos rotavirales) fueron descongelados y centrifugados a 100000 g por 90 min a 4°C, el pellet se resuspendió en TBS (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150mM NaCl, 1mM MgCl₂, 5mM CaCl₂) y se mezcló en relación 1:3 (v/v) con 1, 1, 2 -triclorotrifluoroetano (Freón 113. Sigma, St. Louis, MO, USA). Se dio vortex por 5 min y sus fases fueron separadas a 13000 g por 10 min a 4°C. Se recuperó la fase acuosa y la fase orgánica fue re-extraída con Buffer TBS tres veces. La suspensión viral (fase acuosa), se colocó sobre un gradiente discontinuo de sacarosa/CsCl que contenía [1.4157 g/ml (0.5 ml), 1.3039 g/ml (1 ml) y 1.2070 g/ml (0.5 ml) CsCl (Sigma, St. Louis, MO, USA) y una capa superior de 30% (p/v) de sacarosa (Sigma, St. Louis, MO, USA)]. Se realizó centrifugación isopícnica a 280000 g por 1.5 h a 4°C en un Rotor Sorvall (TST 60.4, N° 11505) las bandas proteicas que contenían las TLPs fueron extraídas con jeringa y disueltas en Buffer TBS, centrifugadas a 100000 g por 1h y el pellet resuspendido en Buffer TBS y se cuantificaron por Nanodrop y almacenaron hasta su uso. El stock de partículas rotavirales purificadas fueron caracterizadas previamente en unidades formadoras de foco-FFU/mL Ecwt [7.8×10^7] (Guerrero, Paula Pardo et al. 2013) y para RRV [6.8×10^7] y Humanos wt [8.5×10^7].

Para obtener DLPs, las TLP s de ECwt y RRV que se encontraban suspendidas en TBS, se trataron con TBS-EDTA 50 mM (TBS-E), sin MgCl₂, ni CaCl₂. Se mantuvieron por 1 h a 37°C, con agitación constante. Se centrifugaron a 101500 g (Rotor Sorvall TST 60.4 (N° 11505) por 1h a 4°C en colchón de sacarosa al 30% y las DLPs de ECwt y RRV obtenidas se resuspendieron en buffer TBS (sin MgCl₂ y CaCl₂) y se cuantificaron por Nanodrop y almacenaron hasta su uso.

3.3.2 Proteínas virales: VP7, recombinantes VP5, VP6 y VP8 (rVP5, rVP6, y rVP8 respectivamente) y recombinantes PDI (rPDI) y Hsc70 (rHsc70): Las proteínas recombinantes virales rVP5, rVP6, rVP8 y la proteína purificada VP7 o recombinantes celulares rPDI y rHsc70 se usaron durante los ensayos de interacción PDI-proteínas virales en un sistema libre de células (acelular).

3.3.2.1 La proteína viral VP7: Se obtuvo por procedimiento estandarizado del laboratorio. a partir de TLPs purificadas de la cepa RRV, mediante SDS-PAGE preparativas con único pozo, en condiciones no reductoras, se cortó una fracción del gel y se realizó la trasferencia a membranas de PVDF, para ubicar la proteína VP7 mediante Western Blot, usando suero policlonal generado en el laboratorio hecho en conejo que reconoce péptidos de VP7(Calderón 2010; Calderón, Guzmán et al. 2012). Ya ubicada la banda en

cada electroforesis (tras tinción con Azul de Coomassie), se cortaron y se procedió a efectuar electroelución de las mismas en una cámara (Electro-Eluter Bio Rad, modelo 422) durante 5h a 10 mA constantes por tubo, en un buffer de corrido (25 mM de Tris, 192 mM de Glicina, y SDS 0.1% (p/v) con pH 8.3). La proteína electroeluida se precipitó con cinco volúmenes de acetona fría al 100% durante toda la noche a -70 °C y se centrifugó a 1700 g (IEC Micro CL 17 centrifuge (Thermo) 2007 D-37520) por 20 min. Posteriormente, se descartó la acetona y el exceso se evaporó mediante campana de vacío y la proteína contenida en el pellet, fue resuspendida en PBS con β -mercaptoetanol 1mM, cuantificada por Nanodrop, distribuida en alícuotas de 20 μ L y almacenada a -20°C en eppendorf hasta su uso.

3.3.2.2 Las proteínas rVP5, rVP6, rVP8, rPDI y rHsc70 (r-recombinante): se obtuvieron de trabajos previos (Poncet, Corthier et al. 1990; Frangioni and Neel 1993; Laboissiere, Chivers et al. 1995; Calderón 2010; Moreno 2010; Moreno, Guerrero et al. 2013) que incluyeron: amplificación y purificación de los vectores que presentan la secuencia génica que codifica las proteínas VP5,VP8, PDI o Hsc70; expresión de las proteínas recombinantes en un sistema de transfección bacteriana (VP5,VP8, PDI o Hsc70) e infección de células de mamífero MA104 con el virus vaccinia recombinante (VP6) y purificación de las proteínas recombinantes mediante cromatografía de afinidad.

Para confirmar la pureza de las proteínas recombinantes trabajadas y de la VP7 electroeluida, concentraciones fijas de éstas (rPDI [216.6 ng/ μ l], rVP5 [129.2 ng/ μ l], rVP6 [62.0 ng/ μ l], rVP8 [178.6 ng/ μ l], rHsc70 [130 ng/ μ l] y VP7 [150 ng/ μ l]) fueron tratadas bajo condiciones reductoras y denaturantes, corridas en una SDS-PAGE y sobre el gel se realizó una tinción con plata.

3.4 ANTICUERPOS Y REACTIVOS

Como anticuerpos y reactivos generales se usaron:

Reactivo	Marca	Referencia/Concentración
<i>Anticuerpos conjugados con HRP anticonejo, anticabra, antiratón (ver nota)</i>	<i>Santa Cruz Biotechnology® NC. ImmunoCruz</i>	<i>Sc-2020 Lot # J0711 (200 μg/0.5 ml)</i>
<i>Anti-PDI</i>	<i>Santa Cruz Biotechnology® NC. ImmunoCruz</i>	<i>(E-20) sc-17222 Lot # B2207. IgG Goat Polyclonal. (H-160) sc- 20132 Lot # B2103. IgG Rabbit Polyclonal.</i>

Anti-Hsc70	Santa Cruz Biotechnology [®] NC. ImmunoCruz	sc-1059. IgG Goat Polyclonal.
HRP-estreptavidina	Invitrogen	
DMEM	Thermo scientific [®]	Cat. No. SH30565.02
MEM	SIGMA [®]	Cat No. D5671 98% HPLC
Ácido 5,5-dithio 2-nitrobenzóico (DTNB)	SIGMA [®]	CAS 69-78-3; D8130-5C
Bacitracina (Bac)	SIGMA [®]	actividad 50000 unidades/g
N-Acetyl-L-Cisteína (NAC)	SIGMA [®]	CAS 616-91-1; Pcode: 1000658728; Lot # 118 k00491
N-Etil-Maleimido (NEM)	Thermo Scientific	CAS 128-53-0; E3876-25G
EZ-link Maleimide-PEG ₂ -Biotin	PIERCE	Prod # 21901; Lot # : GH96753
Western Blotting Luminol Reagent	Santa Cruz Biotechnology [®] NC. ImmunoCruz	sc 2048
Reactivo de Clelands (Ditiotreitol-DTT)	Bio-Rad	cat 161-0611
Ez -link [®] Maleimide-PEO2-Biotin	Pierce	21901
Immobilized Neutravidin TM Protein	Pierce	29200 ((Capturar hasta 20 µg de Biotina por ml de gel)
Proteína A-Agarosa	Bio-Rad	5 %; Cat: 153-6153, L1536153
Membrana de PVDF	Thermo	Prod #: 88518 Lot #: MD1381313

Tabla A. listado de anticuerpos y reactivos usados. Nota: Se usaron como anticuerpos secundarios, los conjugados a peroxidasa de rábano (HRP), anti-conejo-HRP, anti-ratón-HRP o anti-cabra-HPR IgG (Santa Cruz – Biotechnology), o el anticuerpo conjugado a fosfatasa alcalina (AP), anti-conejo-AP IgG (Zymed)

Además, se manejaron sueros policlonales, generados previamente en conejo en nuestro laboratorio, utilizando como antígeno péptidos sintéticos correspondiente a la secuencia de la proteína rotaviral VP7 (189-210) de la cepa Wa¹⁰, VP5, VP6 y VP8 de RRV (Moreno

¹⁰ Péptido que fue analizado por cromatografía HPLC en fase reversa (Jasco LC-2000 Model 2070 photodiodearray) y espectrometría de masas (ESI-Q-TOF, Micromass). Calderón, M. (2010). Actividad Disulfuro Isomerasa de la Superficie Celular Sobre el Durante los Eventos Iniciales del Proceso Infeccioso. Departamento de Ciencias Fisiológicas, Facultad de Medicina. Bogotá Colombia, Universidad Nacional de Colombia. **Doctorado.**

2010), sueros policlonales anti-rotavirus generados en conejo y cabra utilizando como antígeno TLPs rotavirales. También se utilizaron sueros policlonales anti-PDI fracción F(ab')₂ (2mg/ml), anti-PDI y anti-Hsc70, todos generados en conejo en nuestro laboratorio a partir de las proteínas comerciales. Los sueros policlonales anti-PDI hecho en conejo ya habían sido caracterizados y se comprobó previamente mediante western blot y ELISA que no presentan reactividad hacia las TLPs purificadas (Calderón 2010).

3.5 INTERACCIÓN DE PDI Y ROTAVIRUS

Para evaluar la interacción entre PDI-rotavirus se dispuso de inmunoensayos entre los que se cuenta ELISA y el sistema inmunoprecipitación (IP)/SDS-PAGE/Western Blot.

3.5.1 Interacción de la proteína disulfuro isomerasa (PDI) con TLPs de rotavirus Humanos wt, ECwt y RRV y con las DLPs de ECwt y RRV: se extrajeron las vellosidades intestinales, se incubaron durante una hora a 4°C con diluciones del stock de TLPs Humanos wt, ECwt y RRV hasta alcanzar concentración a volumen final de 131.88 ng/μL, [24.74 ng/μL] y [13.545 ng/μL] respectivamente, previamente activados con tripsina (1μg/mL por 20 min a 37°C). A 4 °C se favorece la adhesión de la partícula viral y se espera que el virus sólo tendrá los cambios conformacionales que no dependan de actividad de proteínas celulares y que requieren para dicha actividad ATP. Se sugiere un proceso metabólico disminuido, que reduce la internalización del virus.

Transcurrida 1 hora a 4°C (al que determinamos “tiempo cero”), se incubó por 5 minutos ó 15 min a 37°C, para propiciar los eventos iniciales relacionados con la penetración del rotavirus dentro de la célula. Luego, se centrifugó por 3 min a 2500 g, tres veces, con PBS para retirar virus no unido y no internalizado y las células se lisaron con buffer no iónico (20 mM Tris, 133 mM NaCl, glicerol 10 % (v/v), NP-40 1% (v/v), Tritón x-100 1% (v/v), deoxicolato de sodio 0.1% (p/v) y fenilmetanosulfonilfluoruro-PMSF 0.2 mg/ml como inhibidor de proteasas serina) por 40 min a 37°C en agitación suave (Shaker Schott-Gerate GmbH (Typ SG 22) Nr 868172; 80Hz, 40 Watts; 115 voltios). 50% del lisado se sonicó (Branson sonifier 250W) al 20 % por 3 ciclos, durante 30 segundos y se realizó inmunodetección de PDI o rotavirus por ELISA de captura; el otro 50 % sin sonicar se inmunoprecipitó contra rotavirus, se separó por SDS-PAGE y se detectó a PDI mediante western blot, estableciendo la interacción PDI-rotavirus. Al estandarizar el protocolo se observó que sonicar previo a la inmunoprecipitación de las muestras, facilitó la

disgregación de las fracciones de vellosidades generadas por la lisis y mejoró la resolución en las inmunodetección por ELISAS de captura (Guerrero, Paula Pardo et al. 2013).

3.5.1.2 ELISA de Captura: Los ELISAS de captura se llevaron a cabo tras adaptación de metodologías previas (Guerrero, Calderón et al. 2008; Guerrero, Santana et al. 2010; Moreno 2010; Calderon, Guerrero et al. 2012; Guerrero, Murillo et al. 2012; Guerrero, Paula Pardo et al. 2013). Se realizaron dos esquemas técnicos para ELISA de captura, el primero (llamado **método 1**), como anticuerpo de captura se usó suero policlonal generado en conejo contra el virus y se detectó PDI con suero policlonal generado en cabra o anticuerpo policlonal anti-PDI y su correspondiente anticuerpo conjugado IgG–HRP anticabra. El segundo esquema (llamado **método 2**) como anticuerpo de captura se usó suero policlonal generado en nuestro laboratorio en conejo anti-PDI y se detectó rotavirus utilizando suero policlonal contra rotavirus generado en cabra y su respectivo anticuerpo secundario IgG–HRP anticabra.

La placa de ELISA se incubó con el anticuerpo de captura generado en nuestro laboratorio en conejo (contra rotavirus dilución 1:2000 ó contra PDI dilución 1:1000) toda la noche a 4°C. A continuación, se lavó con PBS¹¹ y bloqueó con caseína al 1 % (p/v) por 2 horas a 37°C. Se descartó el exceso, se lavó la placa, se adicionaron los lisados sonicados y se incubó toda la noche a 4 °C, junto con azida de sodio al 0.02 % (p/v) (concentración que no afecta significativamente la actividad enzimática de la HRP) (Richardson, Chapman et al. 1983). Posteriormente, se lavó e incubó con anticuerpo primario generado en cabra contra rotavirus (suero policlonal dilución 1:2000) ó contra PDI generado en cabra (0.2 µg/mL Santa Cruz Biotechnology) por 1 hora a 37°C, se lavó con PBS-Tween 20 0.1% (v/v) (PBS-T) tres veces y se adicionó anticuerpo secundario IgG –HRP anticabra (0,133 µg/mL Santa Cruz Biotechnology) por 1 hora a 37°C, se lavó con PBS-T tres veces y se reveló con 1 mg/mL de orto-fenilendiamina dihidrocloruro (OPD) y 0.05% (v/v) de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) en buffer 50 mM de citrato de sodio pH 5.0. Después de evidenciar la formación de un color amarillo intenso, producto de la actividad de la HRP, la reacción se detuvo con H₂SO₄ 2.5 M. La lectura de las absorbancias se realizó a 492 nm. Otra opción fue utilizar como anticuerpo secundario un conjugado con fosfatasa alcalina. En este caso, se reveló utilizando como sustrato p-nitrophenylphosphate (Sigma) en buffer de dietanolamina (100 mM de dietanolamina, 1 mM de MgCl₂, 5 mM de azida de sodio, pH 9.4). La lectura se realizó a 405 nm en un lector de ELISAS (Microplate Autoreader EL311-Bio-Tek Instruments)

¹¹ A menos que se indique lo contrario, todos los lavados se hicieron tres veces con PBS

Como control positivo, se detectó en el mismo experimento rotavirus unido a Hsc70 o lo inverso Hsc70 unida a rotavirus (Cely R. 2006; Gualtero, Guzman et al. 2007). Como controles negativos se incubaron todos los anticuerpos utilizados, sin adicionar antígeno (en su lugar se incubó caseína al 1 % (p/v)) y con antígeno utilizando vellosidades no infectadas. Los ensayos fueron realizados por triplicado y el procedimiento se realizó tres veces de manera independiente.

3.5.1.3 Inmunoprecipitación (IP) y western blot: se adaptó protocolo previo (Guerrero, Paula Pardo et al. 2013). El 50% de las muestras lisadas y sonicadas se dispuso para inmunoprecipitar las TLPs de rotavirus Humanos wt, ECwt y RRV. Para esto, del total del lisado dispuesto para IP, el 10%, se tomó como material de entrada (input) y el 90% restante, se inmunoprecipitó con perlas de proteína A-agarosa (BioRad) al 5 % previamente recubiertas con suero policlonal hecho en conejo anti-rotavirus¹² por 40 min a temperatura ambiente en agitación constante. Mediante centrifugación, se lavaron las perlas tres veces con 1 ml de PBS, se adicionó Buffer Leammli con β -mercaptoetanol (β -ME) al 5 % (v/v) y se hirvieron en baño maría por 5 min a 90 °C. Las muestras fueron corridas en un SDS-PAGE al 10% (p/v) y 20 mA/gel. Terminada la electroforesis, las proteínas del gel se electrotransfirieron a una membrana de PVDF en un sistema húmedo usando como buffer de transferencia N-cyclohexyl-3-aminopropanesulfonic acid-CAPS 10 mM y metanol, a pH 11. La membrana fue bloqueada con leche descremada al 5% (p/v) en PBS-Tween 20 al 0.1% (v/v) y azida al 0,02% (p/v) por 2 horas a 37°C, e incubadas con suero policlonal contra PDI generado en cabra (0.2 μ g/ml Santa Cruz Biotechnology) por 1 h a temperatura ambiente, tres lavados con PBS-T e incubación con anticuerpo secundario policlonal IgG –HRP anticabra (0,4 μ g/ml, Santa Cruz Biotechnology) por 1 hora a temperatura ambiente. La detección se realizó por quimioluminiscencia y por el sistema carbazol- H_2O_2 que contiene aminoetilcarbazol (AEC) (Sigma) (1 mg/ml) en 50mM de buffer acetato de sodio, pH 5.0 y 0.04% (v/v) de H_2O_2 .

3.5.2 Interacción de la proteína disulfuro isomerasa recombinante (rPDI) con proteínas virales, TLPs o DLPs de rotavirus mediante ELISA indirecto: por procedimiento estandarizado en laboratorio, en la placa de ELISA se incubaron concentraciones de rPDI, por 2 horas a 37°C, se bloqueó con caseína 0.5 % (p/v) por 2 horas a 37°C y después de tres lavados con PBS, se eliminó el sobrenadante y se agregó o no concentraciones conocidas de DNTB (5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoic acid)) (SIGMA), NAC (N-Acetyl-L-

¹² Las perlas previo a su incubación con el 90% del lisado, fueron tratadas con suero policlonal hecho en conejo anti-rotavirus – Ac anti-rotavirus (dilución 1:20) por 40 min a temperatura ambiente en agitación constante, lavadas tres veces con PBS y centrifugadas a 2500 g durante 3 min por lavado.

Cisteína) o de anticuerpo policlonal anti-PDI generado en cabra (0.2 µg/ml Santa Cruz Biotechnology) por 1 hora a 37°C, se retiró el exceso con PBS, se adicionaron o no concentraciones conocidas de diferentes analitos: TLPs de rotavirus (Humanos wt, RRV, ECwt), de DLPs (RRV, ECwt) o proteínas virales estructurales rVP5, rVP6, VP7 o rVP8 por 2 horas a 37°C, se repitió el lavado, esta vez, con PBS-T 0,1 % (p/v) y se adicionó suero policlonal (generado en conejo dilución 1:2000) anti-analito por 1 hora a 37°C. Se lavó tres veces con PBS-T y se adicionó anticuerpo secundario anticonejo-IgG conjugado con peroxidasa (HRP) (0.133 µg/ml Santa Cruz Biotechnology) por 1 hora a 37°C, se lavó y se reveló con el sistema OPD-H₂O₂. Después de evidenciar la formación de un color amarillo intenso, producto de la actividad de la HRP, la reacción se detuvo con H₂SO₄ 2.5 M. La lectura de las absorbancias se realizó a 492 nm. Como controles negativos de la técnica, se realizaron las incubaciones señaladas en ausencia de alguno de los componentes que se sustituyó por caseína al 1% (p/v). Los ensayos fueron realizados por triplicado y el procedimiento se realizó al menos dos veces de manera independiente.

3.6 NATURALEZA DE LA INTERACCIÓN PDI-ROTAVIRUS

3.6.1 Modificación de la unión PDI-rotavirus: Se sabe que al utilizar agentes bloqueadores del intercambio tiol-disulfuro o anticuerpos anti-PDI, se disminuye la infección de rotavirus en la línea celular MA104 o en vellosidades intestinales (Calderón, Guerrero et al. 2011; Calderon, Guerrero et al. 2012; Guerrero, Murillo et al. 2012; Santana, Guerrero et al. 2013). la modificación de la unión PDI-rotavirus se llevó a cabo mediante el uso de agentes bloqueadores del intercambio tiol-disulfuro en vellosidades intestinales o en fracciones enriquecidas de membranas de vellosidades intestinales de ratón ICR adulto.

Para determinar si la interacción PDI-rotavirus en los sistemas analizados se modifica al utilizar fármacos que afectan el sistema tiol-disulfuro, las vellosidades intestinales aisladas de ratón ICR o las fracciones de membranas extraídas de vellosidades intestinales de ratón ICR adulto, se incubaron en presencia o no de Bac [7.5 mM] (SIGMA®) que contenía PMSF (0.2 mg/ml)(SIGMA®), DTNB [5mM/30mM](SIGMA®), NEM [20mM] (Thermo Scientific), NAC [60mM] (SIGMA®) ó anti-PDI fracción F(ab')₂ (2mg/ml), por 1 hora a 37°C en agitación constante. Se realizaron tres lavados con medio, cetrifugando las vellosidades, cada vez, a 2500 g por 1 min y las fracciones enriquecidas de membranas a 19800 g por 15 min a 4°C. Posteriormente, tanto las vellosidades como las fracciones enriquecidas de membrana se incubaron con TLPs de rotavirus Humanos wt [131.88 ng/µl], ECwt [24.74 ng/µl] ó RRV [13.545 ng/µl], previamente activados con tripsina (1

µg/ml por 20 min a 37°C) por 1 hora en agitación a 4°C (tiempo 0). Estas concentraciones de TLPs corresponden a MOI de 20, 4 y 2 respectivamente, caracterizados en vellosidades para Ecwt y en monocapa de MA104 para RRV y Humanos wt. Luego, todas las muestras se llevaron 5 min a 37°C, se retiró por centrifugación el virus no unido, según el caso (tres lavados con PBS, cetrifugando las vellosidades, cada vez, a 2500 g por 1 min y las fracciones enriquecidas de membranas a 19800 g por 15 min a 4°C). Todas las muestras se trataron con buffer de lisis no ionico pero sólo las vellosidades fueron sonicadas con el protocolo antes expuesto (*ver numeral 3.5.1*). La unión del PDI-rotavirus se detectó mediante la técnica ELISA de captura para las muestras de ambos orígenes (vellosidades y membranas) por los dos métodos descritos arriba (*ver numeral 3.5.1.2*).

De forma alternativa, se incubaron las vellosidades intestinales y las TLPs de Rotavirus por 1 hora a 4°C, se lavó tres veces para retirar virus no unido, cada vez centrifugando a 2500 g por 5 min a 4°C, se resuspendió en medio MEM a 4°C (Tiempo 0) y se mantuvo 5 min a 37°C. A continuación, se agregó los fármacos por 1 hora a 4°C, se centrifugó nuevamente bajo las condiciones anteriores y finalmente se siguió con el protocolo para ELISA por los dos métodos expuestos arriba (*ver numeral 3.5.1.2*).

3.6.2 Detección de cambios oxido-reductores en las cisteinas de rotavirus: mediante el uso de agentes bloqueadores del intercambio thiol-disulfuro en células MA104, en vellosidades intestinales o en fracciones enriquecidas de membranas de vellosidades intestinales de ratón ICR adulto. Con el objetivo de determinar si el poder reductor de las membranas celulares está o no implicado en cambios conformacionales de rotavirus durante eventos iniciales de anclaje de su ciclo infeccioso, se usó un protocolo establecido previamente (Jain, McGinnes et al. 2007; Jain, McGinnes et al. 2009). Brevemente, un promedio de 5×10^5 células MA104 suspendidas en DMEM o 100 mg de fracciones enriquecidas de membranas (peso húmedo) según el caso, fueron tratadas o no con Bac [7,5 mM] (mezclada con PMSF 0.2 mg/ml) o DTNB [7,5 mM] por 1 hora a 37°C, centrifugadas según procedencia¹³ y resuspendidas en DMEM para las células MA104 y en PBS para las fracciones enriquecidas. Luego, las muestras se incubaron 1 hora a 4°C con TLPs de rotavirus RRV [80 ng/µl], Humanos wt [131,88 ng/µl] o ECwt [100 ng/µl] previamente activados con tripsina y se colocaron en agitación con maleimido biotinilado (MPB) en exceso [0.5 mM] (EZ-Link® Maleimide-PEG₂-Biotin-Pierce) por 1 h a 4°C, con el objetivo de capturar grupos sulfidrilos presentes en el sistema. Se detuvo la reacción de

¹³ 2,500 g por 3 min a temperatura ambiente para células MA104 y vellosidades intestinales y 19,800 g por 15 min a 4°C para fracciones enriquecidas de membranas.

MPB con solución de NAC 0,5 mM disuelto en PBS y se hicieron tres lavados con PBS (para retirar exceso de MPB y virus no unido- *ver referencia al pie "13"*). Se descartó el sobrenadante y el pellet fue lisado por un periodo de 40 min a 37°C en agitación suave con buffer no iónico (*ver numeral 3.5.1*) que contiene adicional 2.5 mg de NEM [20 mM] /ml de muestra.

Los lisados se inmunoprecipitaron siguiendo el protocolo 3.5.1.3, incubando las perlas de proteína A-agarosa (BioRad) al 5 % previamente recubiertas con suero policlonal hecho en conejo anti-rotavirus¹⁴ durante 1 hora a 37°C o toda la noche a 4°C en agitación constante. Mediante centrifugación, se lavaron las perlas tres veces con 1 ml de PBS y fueron tratadas con Buffer Leammli y β -mercaptoetanol (β -ME) al 5 % (v/v), se hirvieron en baño maría por 5 min a 90 °C. Según el caso, el contenido total de las muestras o tan sólo el sobrenadante (sin perlas - resultado de una centrifugación a 2,500 g por 3 minutos) se separaron en gel SDS-PAGE al 10% y se transfirieron a membrana de PVDF. La membrana se bloqueó con caseína al 1% (p/v) (en PBS, Tween 20 al 0.1 % y azida de sodio al 0.02%)¹⁵. Se agregó estreptavidina conjugada con peroxidasa (estreptavidina-HRP dilución 1:1000-Invitrogen) por 1 hora a temperatura ambiente y se lavó 3 veces con PBS-T, se reveló por quimioluminiscencia y sistema carbazol-H₂O₂.

3.6.2.1 Remoción de anticuerpos en membranas de PVDF: con el objetivo de establecer en el mismo blot la presencia de todas las proteínas virales estructurales de rotavirus frente a las detectadas por captura de sulfidrilos por MPB, se realizó limpieza de la membrana después de su uso con HRP-estreptavidina, con la finalidad de retirarla de la membrana. Para esto, la membrana de PVDF fue incubada con 100 ml de un buffer de stripping (0,76 g Tris-base, 700 μ L de β -mercaptoetanol, 0,2 g de SDS y H₂O desionizada) por 45 minutos a 50°C en agitación suave, se descartó el sobrante y se realizaron 5 lavados extensivos con buffer de lavado TBS-T (Buffer Tris salino y Tween 20 al 0,1% (v/v) pH 8.0) por 10 minutos cada uno a temperatura ambiente y en agitación suave con la finalidad de eliminar las trazas de β -mercaptoetanol. La membrana posteriormente se incubó con anticuerpo primario anti-rotavirus hecho en cabra y anticuerpo secundario

¹⁴ Las perlas previo a su incubación con el 90% del lisado, fueron tratadas con suero policlonal hecho en conejo anti-rotavirus – Ac anti-rotavirus (dilución 1:20) por 40 min a temperatura ambiente en agitación constante, lavadas tres veces con PBS y centrifugadas a 2500 g durante 3 min por lavado.

¹⁵ Bloquear los sitios inespecíficos durante el Western Blot con Caseína al 1% (p/v) reduce reacciones cruzadas con los anticuerpos; ya que la caseína al ser proteína purificada es menos probable que ocasione un elevado ruido de fondo, comparándolas con otras mezclas de proteínas no purificadas (como es el caso de la leche descremada), sobre todo en los sistemas biotina-streptavidina. Adaptado de: <http://www.cultek.com/index.asp?p=Soluciones-Western-Blot-Productos&id=113>

anti-cabra conjugado con HRP cada uno por 1 hora a 37°C y tres lavados con PBS-T, con posterior detección por quimioluminiscencia.

3.6.3 Detección de sulfidrilos libres en TLPs de la cepa rotaviral Humanos wt: Para detectar las cisteínas libres en las TLPs, las TLPs de rotavirus Humanos wt [131,88 µg/µL] en buffer TNC (10 mM de Tris-HCl, 150 mM de NaCl, 1mM MgCl₂, 10 mM de CaCl₂, pH 7.5), se trataron o no con DTT (Ditiotreitol) [5mM] por 1 hora a 37°C, se retiró el exceso de DTT por protocolo de purificación de TLPs (*ver numeral 3.3.1.1*), las muestras fueron tratadas o no con MPB [0,5 mM] por 30 min a temperatura ambiente en agitación constante con posterior eliminación de exceso nuevamente por purificación de TLPs, inmunoprecipitadas con suero policlonal anti-rotavirus generado en conejo, denaturadas y reducidas con β-ME y Leammli, corridas en SDS-PAGE al 10% y detectadas con HRP-estreptavidina, igual al protocolo expuesto arriba (*ver numeral 3.6.2*).

3.7 Análisis estadístico.

Los datos obtenidos de los ensayos de ELISA fueron analizados empleando el programa *GraphPad Prism v5.0®*. Se aplicó una prueba *t-student no pareada* para determinar si hay diferencias significativas entre la media de cada tratamiento. La significancia se graficó de acuerdo con las siguientes convenciones: *ns*= $P > 0.05$ (*no significativo*); ***= $P < 0.05$ (*significativo*); **** = $P < 0.01$ (*muy significativo*); ***** = $P < 0.001$ (*altamente significativo*).

CAPÍTULO 4

4.1 RESULTADOS Y DISCUSION

4.1.1 PDI y rotavirus se unen en vellosidades aisladas de ratón ICR adulto

PDI está presente en la membrana citoplasmática de vellosidades intestinales de ratón ICR adulto (Gómez 2013; Guerrero, Paula Pardo et al. 2013), por lo que ese sistema celular podría utilizarse para establecer si existe o no unión entre PDI de membrana y rotavirus. Para evaluar la unión PDI-rotavirus se realizaron inmunoensayos de ELISA de captura o ELISA indirecto usando TLPs de cepas rotavirales: ECwt, RRV y los aislados Humanos wt, frente a dos sistemas celulares: vellosidades intestinales aisladas de ratón ICR adulto (Fig. 1A-1F) y fracciones enriquecidas de membrana citoplasmática de vellosidades intestinales aisladas de Ratón ICR adulto (Fig. 1B-C) o frente a un sistema libre de células-modelo acelular (Fig. 3A).

En promedio 0,75 g de vellosidades intestinales (peso húmedo) se incubaron con TLPs Humanos wt [131,88 ng/μl], ECwt [24,74 ng/μl] o RRV [13,545 ng/μl], durante 1 hora a 4°C, posteriormente por 5 o 15 min a 37 °C, se lisó, se sonicó las muestras y se realizó el ELISA de captura mediante dos esquemas técnicos, (método 1- captura rotavirus ó método 2-captura PDI), se observó un incremento en las absorbancias de las vellosidades tratadas con las tres cepas de TLPs de rotavirus al compararlas con las absorbancias de las vellosidades sin TLPs (control negativo). Como control positivo experimental se utilizó TLPs Humanos wt y se detectó Hsc70 ó viceversa (Arias, Isa et al. 2002; Acosta, Calderon et al. 2009). se observó un incremento escalonado en las absorbancias obtenidas: mayor con las TLPs de Humanos wt (1,285-1,328 a los 5 min y 1,050-1,150 a los 15 min), intermedio para las TLPs ECwt (1,183-0,651 a los 5 min y 0,647-0,189 a los 15 min) y menor para las TLPs de RRV (0,568-0,556 a los 5 min y 0,350-0,428 a los 15 min). (Tabla 1 y Fig. 1B). Los datos obtenidos se correlacionan con las concentraciones utilizadas de TLPs de rotavirus; así, para TLPs Humanos wt que se encontraban en mayor concentración con respecto a sus homólogas ECwt y RRV, se obtuvieron absorbancias más altas y para TLPs RRV en donde se utilizó la concentración más baja, las absorbancias obtenidas fueron las más bajas. Con respecto a Hsc70 se observa un incremento significativo en los deltas de absorbancia con respecto al control negativo (Tabla 1 y Fig. 1B).

Los resultados obtenidos en las ELISAS de captura para rotavirus y para PDI indican incrementos significativos en casi todos los promedios de los delta de absorbancia para las tres TLPs de rotavirus tanto a los 5 min como a los 15 min (Tabla 1 y Fig. 1B). En conjunto los resultados sugieren unión de las TLPs de rotavirus con PDI de vellosidades intestinales aisladas de ratón ICR adulto durante los eventos iniciales del ciclo viral.

TRATAMIENTO	CAPTURA ROTAVIRUS					CAPTURA PDI				
	N	M	SD	Valor de p	S	N	M	SD	Valor de p	S
<i>Vellosidades sin TLPs 5 min</i>	2	0	0			2	0	0		
<i>Vellosidades sin TLPs 15 min</i>	2	0	0			2	0	0		
<i>TLPs Humanos wt 5 min</i>	2	1,285	0,163	0,0080	**	2	1,050	0,053	0,0005	***
<i>TLPs Humanos wt 15 min</i>	2	1,328	0,039	0,0004	***	2	1,150	0,002	0,0001	***
<i>TLPs RRV 5 min</i>	2	0,568	0,202	0,0577	ns	2	0,350	0,025	0,0025	**
<i>TLPs RRV 15 min</i>	2	0,556	0,018	0,0005	***	2	0,428	0,039	0,0041	**
<i>TLPs ECwt 5 min</i>	2	1,183	0,340	0,0390	*	2	0,647	0,261	0,0727	ns
<i>TLPs ECwt 15 min</i>	2	0,651	0,359	0,1242	ns	2	0,189	0,083	0,0843	ns
<i>Hsc70 / TLPs Humanos wt</i>	2	1,086	0,535	0,1028	ns					

Tabla 1. Resumen del tratamiento estadístico por t de student no pareada para los resultados de la figura 1B. N. representa el número total de datos; M. la media aritmética de los datos; SD la desviación estándar y S la significancia. Los ensayos fueron realizados por triplicado y el procedimiento se realizó dos veces de manera independiente. Los valores se contrastan frente al control: Vellosidades sin TLPs. La significancia se graficó de acuerdo con las siguientes convenciones: ns= $P > 0.05$ (no significativo); * = $P < 0.05$ (significativo); ** = $P < 0.01$ (muy significativo); *** = $P < 0.001$ (altamente significativo).

Sin embargo, en las condiciones experimentales usadas no es posible establecer una unión PDI-rotavirus directa, ya que es posible que PDI de membrana se encuentre formando un complejo con otras moléculas presentes en el sistema experimental tales como Hsc70 e integrinas, entre otras, y sea a estas que se esté uniendo rotavirus. Además, al usar lisados completos de vellosidades es posible que la PDI detectada o capturada incluya la PDI intracelular. Por estas razones se estandarizó y se utilizó el modelo de fracciones enriquecidas de membrana citoplasmática aisladas de vellosidades intestinales extraídas de ratón ICR adulto.

4.1.2 PDI y rotavirus se unen en fracciones enriquecidas de membrana citoplasmática de vellosidades intestinales aisladas de ratón ICR adulto

En promedio 1,5 g de las vellosidades intestinales aisladas (peso húmedo) fueron sujetas a lisis hipotónica y centrifugaciones sucesivas durante un protocolo de inducción selectiva

de agregación microsomal por iones de calcio, permitiendo obtener en promedio 200 mg de fracciones enriquecidas de membrana citoplasmática. El 50 % del material obtenido se utilizó para analizar la unión de las tres TLPs de rotavirus bajo el diseño experimental de ELISA de captura, como se expuso en el apartado anterior. Puesto que al utilizar la vellosidad completa, los tiempos de incubación 5 y 15 minutos a 37°C no mostraron cambios estadísticamente significativos en los deltas de absorbancia (Tabla 1 y Fig. 1B), para las fracciones enriquecidas de membrana citoplasmática se incubó por 5 min a 37°C.

Detectando PDI o captura de PDI, los resultados mostraron un incremento muy significativo en las absorbancias al incubar las fracciones de membrana con cada una de las tres cepas de TLPs de rotavirus respecto al control negativo (fracciones enriquecidas de membrana citoplasmática no incubadas con TLPs). Los promedios de absorbancias fueron mayores para las TLPs Humanos wt (0,717 y 0,448); intermedias para las TLPs ECwt (0,398 y 0,306) y menores para las TLPs de RRV (0,367 y 0,197) por captura de rotavirus y por captura de PDI respectivamente (Tabla 2 y Fig. 1C). Nuevamente, los datos obtenidos se correlacionan con las concentraciones utilizadas de TLPs de rotavirus. Como control positivo (Arias, Isa et al. 2002; Acosta, Calderon et al. 2009), se detectó en el mismo experimento, rotavirus unido a Hsc70 o lo inverso Hsc70 unida a rotavirus (Fig. 1C).

Los resultados sugieren que durante las primeras etapas de contacto del virus en las fracciones enriquecidas de membrana citoplasmática de vellosidades intestinales las tres cepas de rotavirus se unen directamente o indirectamente con PDI. Lo anterior es concordante con trabajos previos que sugieren que rotavirus se une a un complejo protéico de integrina β 3-Hsc70 que incluye a PDI y a otras proteínas (Gutierrez, Isa et al. 2010; Mayorga, Rubio et al. 2010; Calderón, Guerrero et al. 2011; Guerrero and Moreno 2012; Santana, Guerrero et al. 2013).

4.1.3 PDI de vellosidades intestinales y de fracciones enriquecidas de membrana co-inmunoprecipita con TLPs de rotavirus.

Con el objetivo de corroborar los resultados anteriores, se utilizó un sistema de inmunoprecipitación de rotavirus para el 50% de las muestras de ambas procedencias: vellosidades y fracciones enriquecidas de membrana (Fig. 1D y 1E respectivamente) previamente tratadas o no con TLPs de rotavirus Humanos wt [131,88 ng/ μ l], ECwt [24,74 ng/ μ l] o RRV [13,545 ng/ μ l], inmunoprecipitadas con anticuerpos anti-rotavirus, seguido de una SDS-PAGE en condiciones denatürantes y reductoras y western blot para detectar PDI.

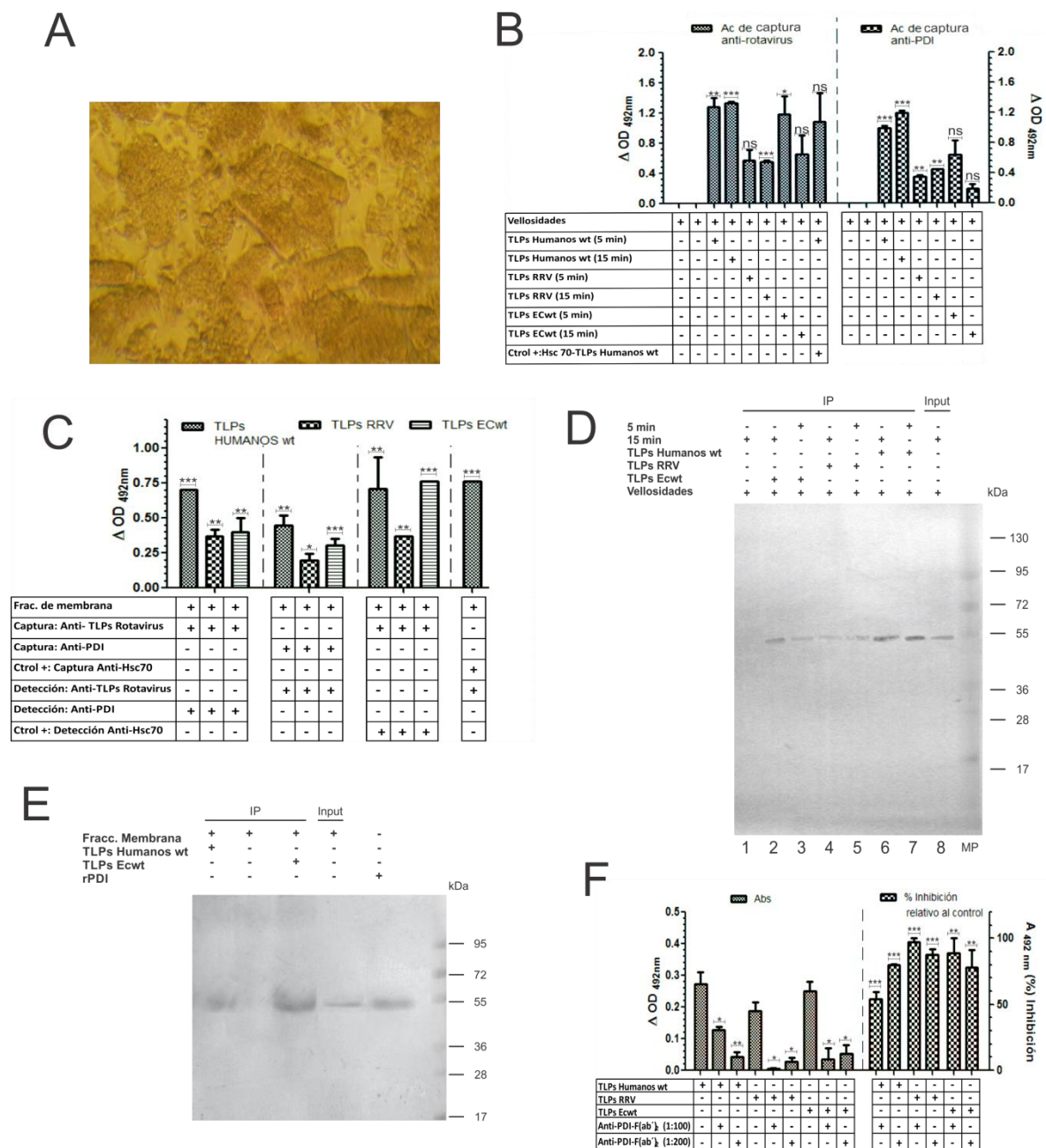


Fig. 1. Unión PDI-TLPs de rotavirus en condiciones celulares. (A) Imagen representativa de las vellosidades extraídas de ratón ICR adulto. Vellosidades intestinales (B y D) o fracciones enriquecidas de membrana celular de vellosidades intestinales (C, E y F) fueron incubadas o no con TLPs de rotavirus a 4 °C. En (B, C y F) se hizo inmunodetección por ELISA de captura, utilizando como Ac de captura anti-rotavirus y para detección anti-PDI (método 1) o como Ac de captura anti-PDI y para detección anti-rotavirus (método 2). (D y E) co-inmunoprecipitación de PDI con TLPs de rotavirus, las muestras fueron inmunoprecipitadas para rotavirus corridas en una SDS-PAGE y transferidas a membrana de western para inmunodetección de PDI. En (F), fracciones de membrana fueron tratadas o no con anti-PDI-F(ab')₂ previo a la incubación con TLPs de rotavirus. Los resultados en (F) son presentados como el porcentaje de inhibición comparado con el control

(fracciones de membrana no tratadas con anti-PDI). ΔDO : resulta de la diferencia de la absorbancia promedio obtenida para los experimentos menos la absorbancia de los controles negativos. Las barras de error representan la desviación estándar (SD) de al menos dos experimentos independientes realizados por triplicado. La significancia se graficó de acuerdo con las siguientes convenciones: ns= $P > 0.05$ (no significativo); * = $P < 0.05$ (significativo); ** = $P < 0.01$ (muy significativo); *** = $P < 0.001$ (altamente significativo).

	<i>TLPs Humanos wt</i>					<i>TLPs RRV</i>					<i>TLPs ECwt</i>				
	<i>N</i>	<i>M</i>	<i>SD</i>	<i>p</i>	<i>S</i>	<i>N</i>	<i>M</i>	<i>SD</i>	<i>p</i>	<i>S</i>	<i>N</i>	<i>M</i>	<i>SD</i>	<i>p</i>	<i>S</i>
CAPTURA ROTAVIRUS	3	0,71	0,03	0,0001	***	3	0,367	0,086	0,0018	**	3	0,398	0,102	0,0025	**
CAPTURA PDI	3	0,45	0,13	0,0034	**	3	0,197	0,081	0,0136	*	3	0,306	0,046	0,0003	***
C+ (1) Hsc70	3	0,74	0,24	0,0057	**	3	0,462	0,100	0,0013	**	3	0,664	0,109	0,0005	***
C+ (2) Hsc70	2	0,70	0,08	0,0005	***										

Tabla 2. Resumen del tratamiento estadístico por *t* de student no pareada para los resultados de la figura 1C. N. representa el número total de datos; M. la media aritmética de los datos; SD la desviación estándar y S la significancia. Los ensayos fueron realizados por triplicado y el procedimiento se realizó tres veces de manera independiente. Los valores se contrastan frente al control: Fracciones de membrana sin TLPs. La significancia se graficó de acuerdo con las siguientes convenciones: ns= $P > 0.05$ (no significativo); * = $P < 0.05$ (significativo); ** = $P < 0.01$ (muy significativo); *** = $P < 0.001$ (altamente significativo).

PDI se detectó en la muestra total (“INPUT”) como una banda alrededor de los 55 kDa (Fig. 1D - carril 8) y no se detectó en las vellosidades intestinales inmunoprecipitadas con anticuerpos anti-rotavirus sin TLPs (Fig. 1D-carril 1). En las vellosidades incubadas con TLPs se encuentra bandas a la altura de los 55 kDa para las diferentes inmunoprecipitaciones: la cepa homóloga ECwt (Fig. 1D-carriles 1 y 2) y las dos heterólogas, humanos wt (Fig. 1D-carriles 6 y 7) y RRV (Fig. 1D-carriles 4 y 5). Este resultado sugiere que bajo las condiciones experimentales PDI se encuentra unida a rotavirus, bien sea directamente o formando un complejo con otras proteínas celulares.

El experimento se repitió utilizando en promedio 0,100 mg de fracciones enriquecidas de membrana citoplasmática en peso húmedo, incubadas o no con TLPs de rotavirus Humanos wt y ECwt, que fueron inmunoprecipitadas contra rotavirus y analizadas por western blot. Se inmunodetectó una banda a la altura de los 55 kDa en el material de entrada (“INPUT”) (Fig. 1E- carril 4) concordante con la rPDI del carril 5 y con la banda detectada en las fracciones enriquecidas de membrana citoplasmática incubadas con TLPs Humanos wt y ECwt e inmunoprecipitadas para el virus (Fig. 1E-carril 1 y 3

respectivamente). La banda no se observa en la muestra inmuprecipitada sin TLPs (Fig. 1E-carril 2).

En conjunto los hallazgos de co-inmunoprecipitación sugieren unión directa entre PDI-rotavirus, o indirecta resultante de un complejo de proteínas asociadas al virus que incluye a PDI.

4.1.4 Anticuerpos anti-PDI inhiben la unión PDI-rotavirus en el modelo de fracciones enriquecidas de membrana citoplasmática aisladas de vellosidades intestinales extraídas de ratón ICR adulto

Al incubar células MA104 con anticuerpos monoclonales anti-PDI mAbs (IgG2a, IgG2b y IgG1) y luego infectar con rotavirus se reduce la infección hasta el 45%, sugiriendo que PDI es importante durante la internalización de rotavirus (Calderón 2010; Calderon, Guerrero et al. 2012). Por esto, utilizando el modelo de fracciones enriquecidas de membrana se pretendió establecer si los anticuerpos anti-PDI inhiben la unión de rotavirus a la membrana citoplasmática aislada de vellosidades intestinales de ratón ICR adulto.

En promedio de 0,100 mg de fracciones enriquecidas de membrana citoplasmática de vellosidades intestinales aisladas de ratón ICR adulto fueron incubadas o no con diluciones de suero policlonal anti-PDI fracción F(ab')₂ (2mg/ml) generado en conejo, se lavaron y se incubación con TLPs de rotavirus Humanos wt [131,88 ng/μl], ECwt [24,74 ng/μl] o RRV [13,545 ng/μl]. Las muestras fueron tratadas con buffer de lisis no iónico y dispuestas en cajas de 96 pozos para ELISA de captura de rotavirus y detección de PDI con anticuerpo policlonal anti-PDI (0,2 μg/ml Santa Cruz Biothecnology) generado en cabra. Se encontró que las fracciones incubadas con concentraciones del orden de 20 μg/mL y 10 μg/mL de la fracción F(ab')₂ anti-PDI, reducen significativamente los deltas de absorbancia: Humanos wt (0,128-0,042), RRV (0,005-0,027) y ECwt (0,035-0,054) (Tabla 3 y Fig. 1F izquierda) respecto a lo hallado cuando se incuban las tres cepas de TLPs rotavirales con las fracciones de membranas sin la fracción F(ab')₂ de anti-PDI: TLPs Humanos wt (0,273), RRV (0,188), ECwt (0,249), sugiriendo unión PDI-rotavirus (Tabla 3).

Los resultados obtenidos en la absorbancia permitieron establecer los porcentajes de inhibición de la unión PDI-rotavirus por parte de 10 μg/mL o 20 μg/mL de los anticuerpos fracción F(ab')₂ anti-PDI, se observa una reducción altamente significativa entre el 50% y el 80% para PDI-TLPs Humanos wt y entre 80 y el 95% para PDI-TLPs RRV o ECwt respectivamente (Tabla 3 y Fig. 1F derecha).

Al utilizar la región F(ab')₂ del anticuerpo para bloquear a PDI sin la porción Fc, disminuye la posibilidad de que la inhibición del anticuerpo sea por impedimento estérico y sugiere especificidad en la unión PDI-rotavirus. Sin embargo, reducciones de hasta un 85% de la unión PDI-rotavirus (Fig. 1F derecha) pero no del 100%, sugiere la implicación de otras moléculas como azúcares (ácido siálico) o proteínas celulares formando complejos (Hsc70, integrina β3) durante la unión del virus con PDI.

TRATAMIENTO	ABSORBANCIAS					% INHIBICIÓN RELATIVO AL CONTROL				
	N	M	SD	p	S	N	M	SD	p	S
TLPs Humanos wt	3	0,273	0,066			3	0	0		
PDI 1/100 Humanos wt	3	0,128	0,017	0,0210	*	3	54	10	0,0007	***
PDI 1/200 Humanos wt	3	0,042	0,027	0,005	**	3	79	1,155	0,0001	***
TLPs RRV	3	0,188	0,048			3	0	0		
PDI 1/100 RRV	2	0,005	0,006	0,0146	*	2	97	4,24	0,0001	***
PDI 1/200 RRV	2	0,027	0,020	0,023	*	2	87,5	6,36	0,0001	***
TLPs ECwt	3	0,249	0,056			3	0	0		
PDI 1/100 ECwt	2	0,035	0,049	0,0223	*	2	89	15,56	0,0017	**
PDI 1/200 ECwt	2	0,054	0,037	0,0239	*	2	78	18,38	0,0040	**

Tabla 3. Resumen del tratamiento estadístico por t de student no pareada para los resultados de la figura 1F. N. representa el número total de datos; M. la media aritmética de los datos; SD la desviación estándar y S la significancia. Los ensayos fueron realizados por triplicado y el procedimiento se realizó tres veces de manera independiente. Los valores se contrastan frente al control: Fracciones de membrana sin anti-PDI y con TLPs. La significancia se graficó de acuerdo con las siguientes convenciones: ns= P>0.05 (no significativo); *= P<0.05 (significativo); ** = P<0.01 (muy significativo); *** = P< 0.001 (altamente significativo).

Es probable que el efecto inhibitorio esté afectado por la posibilidad de un impedimento estérico por parte de la fracción F(ab')₂ generado en conejo, al anticuerpo anti-PDI generado en cabra que se adicionó para detectar PDI durante la prueba de ELISA de captura.

Con todo, los resultados aunque sugieren unión PDI-TLPs de rotavirus, no indican a qué región de la TLP rotaviral se encuentra unida PDI y si esta unión directa o indirecta tiene implicaciones funcionales en el ciclo infeccioso viral.

4.1.5 rPDI soluble se une a TLPs, DLPs y proteínas virales estructurales rVP5, rVP6 y VP7 de rotavirus en un sistema libre de células.

Para determinar si hay unión entre PDI y rotavirus de forma directa se usaron proteínas virales y proteínas recombinantes purificadas (Fig. 3A), partículas de triple capa proteica (TLPs) y de doble capa (DLPs). Para esto, se incubaron 40 ng/μL de rPDI en placa de ELISA,

se bloqueo e incubó con concentraciones de diferentes analitos: TLPs Humanos wt [20 ng/ μ L], TLPs o DLPs de RRV o ECwt [15 ng/ μ L], proteínas virales recombinantes rVP5 [10 ng/ μ L], rVP6 [25 ng/ μ L], rVP8 [20 ng/ μ L] o VP7 [25 ng/ μ L], seguido por incubación con anticuerpo primario anti-analito y secundario conjugado con HRP y detección bajo el sistema OPD-H₂O₂ de estos analitos (Fig. 3B izquierda).

Las absorbancias de los pozos en los que se incubó la rPDI y las TLPs de rotavirus aumentaron con respecto a los pozos donde se incubó sola la rPDI, siendo mayor para las TLPs humanos (0,9), seguido de ECwt (0,43) y por último de RRV (0,37) (Tabla 11-Fig. 3B. sin tratamiento). Bajo las condiciones dadas, sugierese que existe una interacción directa entre PDI y rotavirus apoyando los resultados obtenidos en las condiciones celulares.

Al incubar la rPDI unida a placa de ELISA con proteínas virales estructurales solubles de la capa externa (VP7, VP5 o VP8) o de la capa intermedia (VP6) se incrementaron los deltas de absorbancia: VP5-rPDI (0,68) y VP6-rPDI (0,45) pero VP8-rPDI no incrementó. Este resultado corrobora lo obtenido en otros trabajos (Moreno 2010; Moreno, Guerrero et al. 2013). También se observó incremento en la absorbancia para VP7-rPDI (0,38), sugiriendo que esta proteína viral se une a rPDI.

VP6 es la proteína mayoritaria del virión y queda expuesta en las partículas DLPs. Al usar 15 ng/ μ L de DLPs de RRV y ECwt también se obtienen incrementos en los deltas de absorbancia (0,21 y 0,43 respectivamente), sugiriendo que PDI se une a la VP6 conformacional, en la DLP, como lo hizo con VP6 soluble (Fig. 3B. sin tratamiento).

Se utilizó como control experimental la unión entre las DLPs y la rHsc70 60 ng/ μ L, que mostró incremento en las absorbancias de 0,31 para las DLPs de RRV y de 0,56 para las DLPs de ECwt (Fig. 3B. sin tratamiento). Se utilizó como control experimental la unión entre las DLPs y la rHsc70 [60 ng/ μ L] que mostró incremento en la absorbancia de 0.31 para las DLPs de RRV y de 0,56 para las DLPs de ECwt (Fig. 3B. sin tratamiento).

Los resultados del modelo acelular en conjunto sugieren que PDI puede interaccionar directamente con rotavirus a través de las proteínas virales estructurales VP5, VP6 y VP7, aunque, se desconocen el grado de especificidad, saturabilidad y de afinidad de esta unión. Sin embargo, el diseño experimental no permite establecer una asociación funcional de la unión entre PDI y rotavirus en el contexto de internalización del virus, por lo que se hace importante determinar si la interacción entre PDI y rotavirus es fisiológicamente funcional.

4.1.6 Alterar el intercambio tiol-disulfuro disminuye la interacción PDI-rotavirus.

Como se relacionó en el marco conceptual apartado 1.2.2 la actividad oxido reductora de la superficie celular es inhibida por bloqueadores del intercambio tiol-disulfuro que sean impermeables a la membrana celular, como el ácido 5,5-dithio 2- nitrobenzónico (DTNB) que reaccionan con tioles libres o de la Bacitracina (Bac) que se une a los motivos CGHC e inhibe la función chaperona de PDI. También es posible afectar el estado redox mediante la alteración de la relación estequiométrica glutatión reducido/glutatión oxidado con la N-Acetyl-L-Cisteína (NAC) o bloquear a la PDI de membrana con anticuerpos anti-PDI o alterar los tioles por N-Etil-Maleimido (NEM) (Mandel, Ryser et al. 1993; Ryser, Levy et al. 1994; Gallina, Hanley et al. 2002; Karala and Ruddock 2010; Dickerhof, Kleffmann et al. 2011; Calderon, Guerrero et al. 2012; Guerrero, Paula Pardo et al. 2013).

Los resultados muestran que el pre-tratamiento de vellosidades intestinales completas o las fracciones enriquecidas de membrana citoplasmáticas con DTNB [5 y 30 mM] , Bac [7,5 mM], NAC [60 mM] o NEM [20 mM], con posterior incubación con TLPs, disminuye los deltas de absorbancia respecto al control (vellosidades completas o fracciones de membranas no tratadas e incubadas con TLPs de rotavirus Humanos wt y ECwt) (Ver Tablas 4-7) (Fig. 2A y B izquierda) (Fig. 2C y D izquierda). Con DLPs de rotavirus RRV y ECwt se observa también una reducción en los deltas de absorbancia comparada con el control (fracciones de membrana tratadas con TLPs o DLPs de rotavirus) (Ver tabla 9) (Fig. 2E izquierda).

Mediante ELISAS de captura, las muestras de vellosidades intestinales tratadas con Bac [7,5 mM] genera una disminución del 89 % por el método 1 y del 80 % por el método 2 para las TLPs Humanos wt, siendo altamente significativa tanto en los deltas de absorbancia como en los porcentajes de inhibición. Para TLPs de ECwt la inhibición oscila entre el 40 % por el método 1 y del 65 % por el método 2. (Tabla 4 y 5 - Fig. 2A y B derecha), siendo diferencia significativa.

Lo anterior sugiere que al afectar los motivos CGHC de PDI, o de otras moléculas de membrana con dominios tipo tioredoxina, por el tratamiento con Bac se inhibe la unión entre PDI-rotavirus. El que Bac afecte la actividad chaperona de la membrana sugiere que esta función es importante durante el proceso infeccioso de rotavirus (Karala and Ruddock 2010; Dickerhof, Kleffmann et al. 2011).

El tratamiento con Bac inhibe más las TLPs Humanos wt que a ECwt sugiriendo algún grado de especificidad dependiente de cepa rotaviral, situación que se ha visto cuando se utiliza este fármaco sobre la misma línea celular infectada con diferentes cepas rotavirales (Calderón 2010). Probablemente, los rotavirus humanos son más dependientes de PDI,

mientras que las demás cepas no y utilizan otras proteínas de membrana que ejercen la misma función, como ERp57 u otras Tioeredoxinas.

TRATAMIENTO	ABSORBANCIAS CAPTURA ROTAVIRUS					% INHIBICIÓN RELATIVO AL CONTROL				
	N	M	SD	p	S	N	M	SD	p	S
Bac [7.5mM]- Humanos wt	4	0,08	0,07	0,0001	***	4	89	8,602	0,0001	***
DTNB [5mM]-Humanos wt	2	0,36	0,27	0,037	*	2	53	36,77	0,0291	*
DTNB[30mM]- Humanos wt	2	0,01	0,02	0,0001	***	2	98	2,828	0,0001	***
NEM [20mM]- Humanos wt	4	0,12	0,15	0,0003	***	4	83	21,39	0,0002	***
NAC [60mM]- Humanos wt	4	0,29	0,12	0,0006	***	4	59	18,32	0,0006	***
TLPs Humanos wt	4	0,73	0,05			4	0	0		
Bac [7.5mM] TLPs ECwt	4	0,42	0,18	0,028	*	4	40	21,41	0,0089	**
DTNB [5mM] TLPs ECwt	3	0,47	0,19	0,0667	ns	3	36	24,01	0,025	*
DTNB [30mM] TLPs ECwt	2	0,04	0,06	0,0003	***	2	94	8,485	0,0001	***
NEM [20mM] TLPs ECwt	4	0,23	0,15	0,0014	**	4	65	26	0,0023	**
NAC [60mM] TLPs ECwt	4	0,31	0,17	0,006	**	4	56	21,76	0,0022	**
TLPs ECwt	4	0,7	0,07			4	0	0		

Tabla 4. Resumen del tratamiento estadístico por *t* de student no pareada para los resultados de la figura 2A. ELISA de captura rotavirus. N. representa el número total de datos; M. la media aritmética de los datos; SD la desviación estándar y S la significancia. Los ensayos fueron realizados por triplicado y el procedimiento se realizó al menos dos veces de manera independiente. Los valores se contrastan frente al control: vellosidades intestinales con TLPs sin fármacos. La significancia se graficó de acuerdo con las siguientes convenciones: ns= P>0.05 (no significativo); *= P<0.05 (significativo); ** = P<0.01 (muy significativo); *** = P< 0.001 (altamente significativo).

Con DTNB se observa menor porcentaje de inhibición para la concentración de 5 mM (que oscilan entre un 50 % para Humanos wt y del 30 % para ECwt por ambos métodos- captura rotavirus y captura PDI). Para la concentración de 30 mM la inhibición fue mayor (con medias aritméticas que están entre un 80 % para Humanos wt y del 85% para ECwt). Se observó diferencias significativas entre las concentraciones de DTNB al analizar los deltas de absorbancias y en los porcentajes de inhibición (Tabla 4 y 5 - Fig. 2A y B).

TRATAMIENTO	ABSORBANCIAS CAPTURA PDI					% INHIBICIÓN RELATIVO AL CONTROL				
	N	M	SD	p	S	N	M	SD	p	S
Bac [7.5mM] TLPs Humanos wt	5	0,124	0,170	0,0004	***	5	80,6	26,848	0,0002	***
DTNB [5mM] TLPs Humanos wt	3	0,465	0,377	0,1829	ns	3	46	30,806	0,0122	*
DTNB [30mM] TLPs Humanos wt	2	0,171	0,242	0,0133	*	2	71	41,012	0,0057	**
NEM [20mM] TLPs Humanos wt	4	0,529	0,116	0,0619	ns	4	30,75	13,074	0,0011	**
NAC [60mM] TLPs Humanos wt	5	0,273	0,132	0,0011	**	5	62,6	21,326	0,0002	***
TLPs Humanos wt	5	0,748	0,166			5	0	0		
Bac [7.5mM] TLPs ECwt	3	0,243	0,133	0,0136	*	3	65,333	27,209	0,0042	**
DTNB [5mM] TLPs ECwt	3	0,536	0,010	0,1337	ns	3	29,667	19,858	0,0271	*
DTNB [30mM] TLPs ECwt	2	0,080	0,0208	0,0119	*	2	86,500	4,95	0,0001	***
NEM [20mM] TLPs ECwt	3	0,531	0,231	0,3117	ns	3	34,000	4,242	0,0001	***
NAC [60mM] TLPs ECwt	3	0,322	0,198	0,0382	*	3	56,333	35,133	0,0210	*
TLPs ECwt	4	0,752	0,204			4	0	0		

Tabla 5. Resumen del tratamiento estadístico por t de student no pareada para los resultados de la figura 2B. ELISA de captura PDI. N. representa el número total de datos; M. la media aritmética de los datos; SD la desviación estándar y S la significancia. Los ensayos fueron realizados por triplicado y el procedimiento se realizó al menos dos veces de manera independiente. Los valores se contrastan frente al control: vellosidades intestinales con TLPs sin fármacos. La significancia se graficó de acuerdo con las siguientes convenciones: ns= P>0.05 (no significativo); *= P<0.05 (significativo); ** = P<0.01 (muy significativo); *** = P< 0.001 (altamente significativo).

Si bien es cierto que DTNB no es inhibidor específico de PDI, si tiene la capacidad de inhibir sus actividades oxido-reductoras por unión al sitio activo.(Gowthaman, Jayakanthan et al. 2008) DTNB al ser impermeable a membrana celular y unirse a grupos tiol afecta directamente el estado redox de membrana celular, que incluye a PDI, lo que sugiere que esta reducción en la unión PDI-rotavirus es consecuencia de afectar los tioles libres en membrana, que el estado redox es importante para o durante la unión PDI-rotavirus. DTNB puede estar afectando otras proteínas que alternativamente el rotavirus puede utilizar para efectuar los cambios oxido-reductores necesarios durante los cambios conformacionales en el proceso de unión y entrada a la célula. Todo dependerá de la cepa de rotavirus y si en la membrana de la célula están las proteínas oxido-reductoras. Un trabajo previo indica que ERp57 se encuentra en la membrana de la vellosidad de ratones ICR, junto con PDI, y se disminuye la infección al bloquear con un anticuerpo anti-ERp57 (Santana, Guerrero et al. 2013).

TRATAMIENTO	ABSORBANCIAS CAPTURA ROTAVIRUS					% INHIBICIÓN RELATIVO AL CONTROL				
	N	M	SD	p	S	N	M	SD	p	S
<i>Bac [7.5mM] TLPs HUMANOS wt</i>	2	0,371	0,202	0,0539	ns	2	29,00	4,24	0,001	***
<i>DTNB [5mM] TLPs HUMANOS wt</i>	2	0,528	0,003	0,0001	***	2	24,50	0,71	0,0001	***
<i>DTNB [30mM] TLPs HUMANOS wt</i>	2	0,216	0,173	0,0130	*	2	64,00	31,11	0,0299	*
<i>NEM [20mM] TLPs HUMANOS wt</i>	2	0,248	0,068	0,0011	**	2	64,00	9,90	0,0012	**
<i>NAC [60mM] TLPs HUMANOS wt</i>	2	0,027	0,038	0,0001	***	2	96,00	5,66	0,0001	***
<i>TLPs HUMANOS wt</i>	3	0,700	0,000			3	0,00	0,00		
<i>Bac [7.5mM] TLPs RRV</i>	2	0,179	0,033	0,0542	ns	2	41,50	16,26	0,0689	ns
<i>DTNB [5mM] TLPs RRV</i>	2	0,094	0,022	0,0158	*	2	69,00	9,90	0,0101	*
<i>DTNB [30mM] TLPs RRV</i>	2	0,124	0,086	0,0987	ns	2	71,00	9,90	0,0096	**
<i>NEM [20mM] TLPs RRV</i>	2	0,168	0,046	0,0670	ns	2	47,00	8,49	0,0159	*
<i>NAC [60mM] TLPs RRV</i>	2	0,009	0,012	0,0066	**	2	97,00	4,24	0,0010	***
<i>TLPs RRV</i>	2	0,315	0,033			2	0,00	0,00		
<i>Bac [7.5mM] TLPs ECwt</i>	2	0,451	0,287	0,7028	ns	2	27,50	13,44	0,0302	*
<i>DTNB [5mM] TLPs ECwt</i>	3	0,391	0,364	0,5565	ns	3	42,00	23,07	0,0344	*
<i>DTNB [30mM] TLPs ECwt</i>	3	0,186	0,018	0,1517	ns	3	59,67	18,18	0,0047	*
<i>NEM [20mM] TLPs ECwt</i>	2	0,118	0,166	0,2215	ns	2	61,00	55,15	0,1268	ns
<i>NAC [60mM] TLPs ECwt</i>	2	0,298	0,158	0,4095	ns	2	54,50	23,33	0,0214	*
<i>TLPs ECwt</i>	3	0,590	0,395			3	0,00	0,00		

Tabla 6. Resumen del tratamiento estadístico por *t* de student no pareada para los resultados de la figura 2C. ELISA de captura rotavirus N. representa el número total de datos; M. la media aritmética de los datos; SD la desviación estándar y S la significancia. Los ensayos fueron realizados por triplicado y el procedimiento se realizó al menos dos veces de manera independiente. Los valores se contrastan frente al control: fracciones de membrana con TLPs sin fármacos. La significancia se graficó de acuerdo con las siguientes convenciones: ns= P>0.05 (no significativo); * = P<0.05 (significativo); ** = P<0.01 (muy significativo); *** = P< 0.001 (altamente significativo).

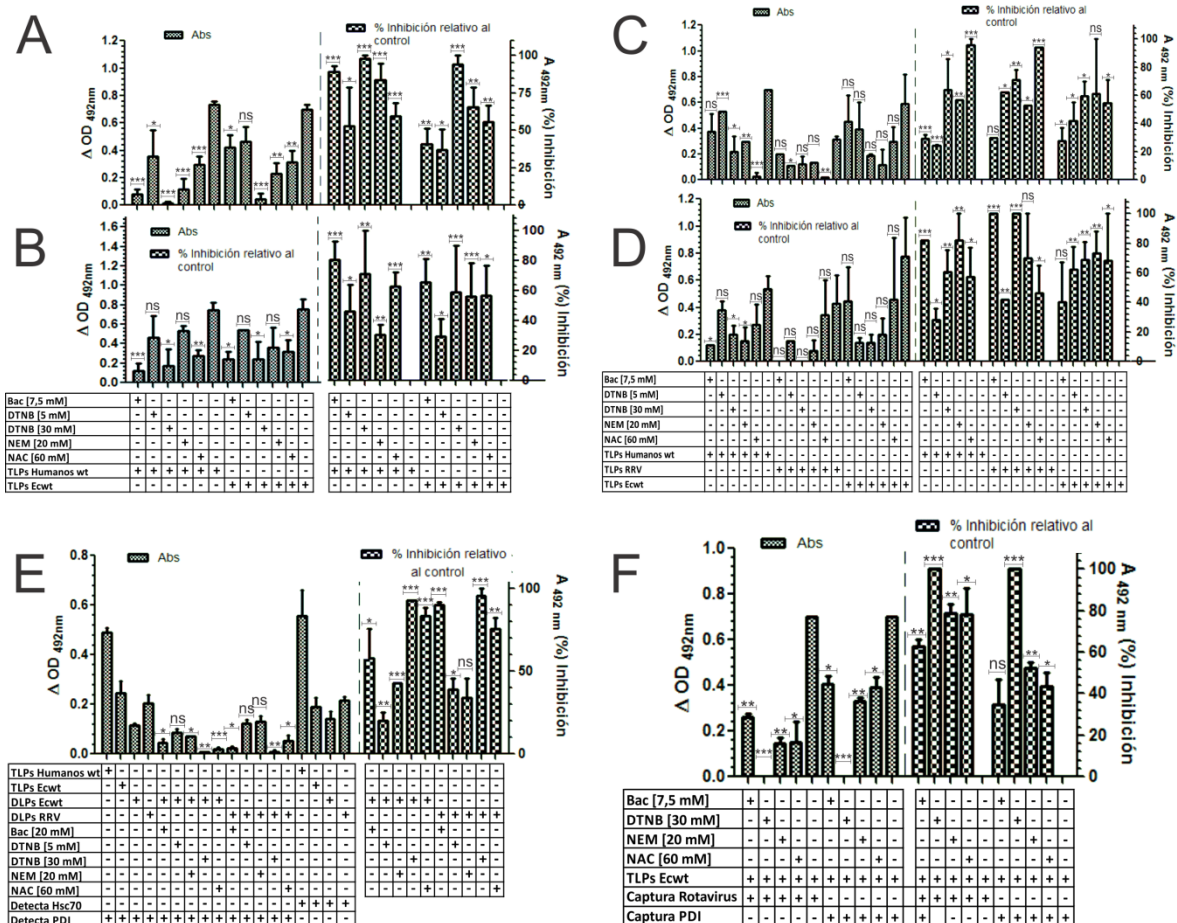


Fig. 2. Alteración del intercambio tiol-disulfuro previo o durante la unión PDI-rotavirus. ELISA de captura indicando modificaciones de la unión TLPs-PDI (A-D y F) o DLPs-PDI (E). Luego de incubar por 1 h a 37 °C vellosidades intestinales (A, B) o fracciones enriquecidas de membrana citoplasmática de vellosidades intestinales (C, D y E) con diferentes moléculas que alteran la capacidad redox (Bac, DTNB, NAC o NEM), se incubó con TLPs (A-F) o con DLPs (E) por 1 h a 4 °C. En (A, C, E y F) y se utiliza como Ac de captura anti-rotavirus y para detección anti-PDI (método 1). En (B, D y F) o se utiliza como Ac de captura anti-PDI y para detección anti-rotavirus (método 2). (F) Ensayo de unión e inhibición pos-unión de la interacción TLPs ECwt - PDI por acción de fármacos en vellosidades intestinales extraídas de ratón ICR adulto macho. Posterior a la incubación de las vellosidades con TLPs de ECwt por 1 h a 4°C, se reta el virus frente a fármacos que alteran la capacidad redox. Δ DO: resulta de la diferencia de la absorbancia promedio obtenida para los experimentos menos la absorbancia de los controles negativos. Las barras de error representan la desviación estándar (SD) de al menos dos experimentos independientes realizados por triplicado. La significancia se graficó de acuerdo con las siguientes convenciones: ns = P>0.05 (no significativo); * = P<0.05 (significativo); ** = P<0.01 (muy significativo); *** = P<0.001 (altamente significativo).

En los ensayos de vellosidades intestinales utilizando el reactivo NEM [20 mM] cuando se hizo la detección de rotavirus, se redujo los deltas de absorbancias pero la variabilidad en las absorbancias obtenidas no fue estadísticamente significativa. Sin embargo, al convertir

las absorbancias como porcentajes de inhibición se observó un incremento altamente significativo en la inhibición, alcanzando valores de inhibición de hasta un 50 % para las vellosidades previamente tratadas con NEM 20 mM antes de incubar con TLPs Humanos wt o ECwt (Tabla 4 y 5 - Fig. 2A y B Derecha), con respecto al control (vellosidades intestinales sin NEM incubadas con TLPs Humanos wt o ECwt). NEM no es inhibidor específico de PDI y dado que sólo se utilizó una concentración de NEM, es probable que la concentración del fármaco no hubiese sido suficiente para lograr el efecto inhibitorio mayor al 50%, porque se consume en diversas reacciones o recambios rápidos que sufren otras moléculas que tienen sulfidrilos y unen NEM, agotándolo y disminuyendo su concentración efectiva. Esto no ocurre con DTNB porque es impermeable a membrana, mientras NEM no.

Con NAC [60 mM] se observa una mayor homogeneidad en los resultados obtenidos para las dos TLPs Humanos wt y ECwt y por los dos métodos de ELISA de captura. Un promedio de inhibición del 60% en reducción de los deltas de absorbancia con respecto al control que sugiere una significativa disminución de la unión PDI-rotavirus (Tabla 4 y 5 - Fig. 2A y B Derecha).

Se utilizó la concentración de NAC [60 mM] porque en trabajos previos concentraciones entre 50-80 mM y no afecta la viabilidad celular, pero si produce una reducción de hasta un 80% en la infectividad de rotavirus (Guerrero, Murillo et al. 2012; Guerrero, Paula Pardo et al. 2013). En el modelo estudiado, no se puede determinar si NAC afecta la estequiometría y estado redox de PDI de superficie celular, porque NAC penetra la membrana celular y afecta el estado redox intracelular. Sin embargo, es posible que parte de NAC reaccione con los tioles expuestos en la superficie de membrana, que incluye a PDI afectando la unión con rotavirus. Para analizar esto, se repitió el experimento en fracciones enriquecidas de membranas citoplasmática como se describe posteriormente.

En resumen, al tratar las vellosidades intestinales con fármacos que bloquean el estado redox de superficie celular o que afectan el balance redox intracelular y luego incubar con TLPs de rotavirus Humanos wt o ECwt en promedio se disminuyen los deltas de absorbancia con Bac 7,5 mM (84% y 52%), DTNB 5mM (50% y 33%), DTNB 30 mM (85% y 90 %), NEM 20 Mm (55% y 50%) y de NAC (60% y 55%) (Tabla 6-8- Fig. 2C y D).

TRATAMIENTO	ABSORBANCIAS CAPTURA PDI					% INHIBICIÓN RELATIVO AL CONTROL				
	N	M	SD	p	S	N	M	SD	p	S
Bac [7.5mM] TLPs HUMANOS wt	2	0,111	0,016	0,0448	*	2	78,000	5,657	0,0001	***
DTNB [5mM] TLPs HUMANOS wt	2	0,380	0,096	0,3718	ns	2	28,000	11,314	0,0046	*
DTNB [30mM] TLPs HUMANOS wt	4	0,198	0,134	0,0298	*	4	60,500	29,422	0,0063	**
NEM [20mM] TLPs HUMANOS wt	2	0,154	0,140	0,0339	*	2	82,000	25,456	0,0017	**
NAC [60mM] TLPs HUMANOS wt	3	0,270	0,259	0,1837	ns	3	57,333	34,034	0,0175	*
TLPs HUMANOS wt	4	0,533	0,195			4	0,000	0,000		
Bac [7.5mM] TLPs RRV	2	0,000	0,000	0,2112	ns	2	100,000	0,000	0,0001	***
DTNB [5mM] TLPs RRV	2	0,119	0,047	0,3367	ns	2	47,500	7,778	0,0014	**
DTNB [30mM] TLPs RRV	2	0,000	0,000	0,2112	ns	2	100,000	0,000	0,0001	***
NEM [20mM] TLPs RRV	2	0,078	0,110	0,2940	ns	2	70,000	42,426	0,0520	ns
NAC [60mM] TLPs RRV	2	0,346	0,363	0,8210	ns	2	46,500	26,163	0,0433	*
TLPs RRV	3	0,428	0,362			3	0,000	0,000		
Bac [7.5mM] TLPs ECwt	3	0,445	0,437	0,4392	ns	3	40,000	46,862	0,1375	ns
DTNB [5mM] TLPs ECwt	3	0,139	0,064	0,1164	ns	3	62,333	26,407	0,0045	**
DTNB [30mM] TLPs ECwt	4	0,138	0,127	0,07	ns	4	69,000	23,875	0,0012	**
NEM [20mM] TLPs ECwt	3	0,200	0,211	0,16	ns	3	73,333	25,580	0,0019	**
NAC [60mM] TLPs ECwt	2	0,457	0,646	0,5625	ns	2	68,500	44,548	0,0238	*
TLPs ECwt	4	0,777	0,566			4	0,000	0,000		

Tabla 7. Resumen del tratamiento estadístico por t de student no pareada para los resultados de la figura 2D. ELISA de captura PDI. N. representa el número total de datos; M. la media aritmética de los datos; SD la desviación estándar y S la significancia. Los ensayos fueron realizados por triplicado y el procedimiento se realizó al menos dos veces de manera independiente. Los valores se contrastan frente al control: fracciones de membrana con TLPs sin fármacos. La significancia se graficó de acuerdo con las siguientes convenciones: ns= P>0.05 (no significativo); *= P<0.05 (significativo); ** = P<0.01 (muy significativo); *** = P< 0.001 (altamente significativo).

El trabajar con vellosidades completas no permite discriminar el efecto de algunos reactivos que interfieren el mecanismo redox de membrana citoplasmática con la intracelular; por esto, se aplicó el mismo esquema metodológico en fracciones enriquecidas de membrana celular aisladas de vellosidades intestinales de ratón ICR adulto. Se observó reducciones promedio en los deltas de absorbancia con Bac 7,5 mM (53%, 70% y 34%), DTNB 5mM (26%, 58% y 52%), DTNB 30 mM (62%, 85% y 65 %), NEM 20 Mm (73%, 58% y 67%) y de NAC (77%, 72% y 60%) para las TLPs Humanos wt, RRV o ECwt respectivamente, respecto al control (PDI-TLPs sin reactivos) (Tabla 6-8- Fig. 2C y D).

Al comparar las medias de % de inhibición para el modelo de vellosidades integra y de fracciones de membrana se observa que independiente del modelo utilizado, existe una tendencia de inhibición que supera el 50 % para los diferentes tratamientos exceptuando DTNB 5 mM (Tabla 8).

	<i>TLPs Humanos wt</i>		<i>TLPs ECwt</i>	
<i>Tratamiento</i>	<i>Vellosidades</i>	<i>Fracciones de Membrana</i>	<i>Vellosidades</i>	<i>Fracciones de Membrana</i>
<i>Bac [7,5 mM]</i>	84	53	52	34
<i>DTNB [5mM]</i>	50	26	33	52
<i>DTNB [30 mM]</i>	85	62	90	65
<i>NEM [20 mM]</i>	55	73	50	67
<i>NAC [60 mM]</i>	60	77	55	60

Tabla 8. Porcentajes de inhibición de la unión PDI-rotavirus por acción de agentes que bloquean el estado redox. Los valores son los promedios de los porcentajes de inhibición de las tablas 4-7 por dos métodos de ELISA de captura, en dos modelos celulares y para dos TLPs de rotavirus: Humanos wt y ECwt.

En conjunto los resultados arrojados, sugieren que el intercambio tiol disulfuro es importante durante o para la unión PDI-rotavirus. Sin embargo, se debe considerar que el estado redox no es el único condicionante de la interacción PDI-rotavirus, puesto que rotavirus se une al ácido siálico o integrinas, el primero de estos, independiente del estado redox (Arias, Isa et al. 2002). Esto explica por qué la inhibición del estado redox de membrana por bloqueo de los tioles disponibles no genera una inhibición del 100% en la unión rotavirus-célula.

Al analizar la relación DLPs-PDI en el modelo de fracciones enriquecidas de membrana, se incubaron estas últimas con 15 µg/mL de DLPs obtenidas a partir de TLPs de RRV o ECwt, se obtuvo por ELISA de captura de rotavirus, un incremento en los deltas de absorbancia con respecto al control, (membranas sin DLPs) (Tabla 9 y Fig. 2E-izquierda). Los deltas de absorbancia se redujeron al tratar las fracciones con fármacos que alteran el estado redox, y luego incubarlas con las DLPs de rotavirus (Tabla 9 y Fig. 2E).

Entre las diferentes DLPs (RRV y ECwt), las reducciones en los porcentajes de inhibición son significativos en la misma magnitud cuando se compara con el mismo tratamiento exceptuando Bac [7,5 mM] que inhibe un 58% para DLPs de ECwt y 90 % para DLPs de RRV. Se encuentran diferencias entre los promedios de tratamientos versus DLPs sin tratamiento: con Bac del 70%, DTNB [5 mM] del 30%, DTNB [30 mM] del 95%, NEM [20 mM] del 40% y con NAC [60 mM] del 80% (Tabla 9 y Fig. 2E). Las reducciones significativas en los deltas de absorbancia concuerdan con lo encontrado con TLPs rotavirales, en el mismo modelo de fracciones de membrana (Fig. 2C y D). Dado que VP6 es la proteína viral estructural de las DLPs, los datos encontrados sugieren que PDI se une a VP6, apoyando lo hallado en el modelo acelular, discutido en el apartado 4.1.5 (Fig. 3B – sin tratamiento).

Tanto en el modelo de fracciones de membrana, como en el sistema libre de células, la interacción entre PDI-DLPs son menores frente a los de PDI-TLPs a pesar de utilizar la misma concentración de DLP o TLP. Lo anterior sugiere que PDI no sólo se estaría uniendo

a rotavirus a través de VP6 sino también de VP7 y VP4, como se encontró en el sistema libre de células al incubar rPDI con las proteínas solubles VP7 o rVP5 de rotavirus (Fig. 3B-sin tratamiento).

De forma alternativa, vellosidades de membrana fueron incubadas primero con TLPs de ECwt y posteriormente se retaron frente a los fármacos Bac [7,5 mM], DTNB [5 mM], NEM [20 mM] o NAC [60 mM] todo a 4 °C. A continuación las muestras fueron lisadas, sonicadas y dispuestas para ELISA por captura de rotavirus (método 1) y captura de PDI (método 2). Los resultados de la figura 2F muestran que por ambos métodos se presenta un descenso significativo en los deltas de absorbancia para el sistema PDI-TLPs ECwt con reducciones promedios del 50% para Bac, 100% para DTNB, 65% para NEM y 61 % para NAC (Tabla 10 y Fig. 2F derecha). Esto sugiere que Bac compite en el motivo CGHC de PDI, con la unión PDI-rotavirus y que la unión implica tioles expuestos en la membrana celular a juzgar por la inhibición de NEM y NAC es probable que el estado redox intracelular sea importante para mantener esta unión.

Se ha sugerido que DTNB afecta directamente la estabilidad de la partícula TLP, provocando el desensamblaje de la misma (Calderón 2010) explicando en parte el efecto de inhibición del 100% en la unión PDI-rotavirus, sugiriendo que la conformación espacial de la partícula rotaviral es importante durante esta unión.

Al incubar rPDI con TLPs, DLPs o VPs (VP7, rVP6 y rVP5) de rotavirus hay unión, sin embargo, no lo hace a la proteína VP8 (Fig. 3B y apartado 4.1.5). Para establecer si esta unión directa tiene como condicionante mantener el estado reductor de PDI, la rPDI fue tratada con DTNB 5 mM, NAC 60 mM o con anticuerpos anti-PDI dilución 1:1000 antes de incubar con las TLPs, DLPs o VPs de rotavirus.

Las interacciones obtenidas por ELISA indirecto muestran que frente al control (rPDI sin fármacos) se presenta una reducción significativa en las absorbancias de las muestras que fueron tratadas con DTNB, NAC o anticuerpos anti-PDI (Tabla 11 y Fig. 3B).

TRATAMIENTO	ABSORBANCIAS CAPTURA ROTAVIRUS					% INHIBICIÓN RELATIVO AL CONTROL				
	N	M	SD	P	S	N	M	SD	p	S
TLPs Humanos wt	3	0,492	0,029							
TLPs ECwt	3	0,245	0,083							
DLPs ECwt	3	0,116	0,012			3	0	0		
DLPs RRV	3	0,206	0,054			2	0	0		
Bac [20mM] DLPs ECwt	2	0,045	0,023	0,0180	*	2	58,000	25,456	0,0228	*
DTNB [5mM] DLPs ECwt	2	0,089	0,018	0,1260	ns	2	20,500	6,364	0,0088	**
NEM [20mM] DLPs ECwt	2	0,064	0,011	0,0163	*	2	44,000	1,414	0,0001	***
DTNB [30mM] DLPs ECwt	2	0,004	0,006	0,0014	**	2	96,500	4,950	0,0001	***
NAC [60mM] DLPs ECwt	3	0,019	0,012	0,0006	***	3	83,667	9,018	0,0001	***
Bac [20mM] DLPs RRV	2	0,024	0,009	0,0205	*	2	90,000	2,828	0,0005	***
DTNB [5mM] DLPs RRV	3	0,123	0,030	0,0803	ns	3	39,000	12,000	0,0223	*
NEM [20mM] DLPs RRV	3	0,132	0,038	0,1218	ns	3	34,000	20,518	0,1127	ns
DTNB [30mM] DLPs RRV	3	0,009	0,016	0,0037	**	3	95,667	7,506	0,0004	***
NAC [60mM] DLPs RRV	3	0,054	0,040	0,0172	*	3	75,667	11,930	0,0034	**
TLPs Humanos wt-Hsc70	3	0,558	0,179							
TLPs ECwt-Hsc70	3	0,192	0,064							
DLPs ECwt Hsc70	3	0,144	0,047							
DLPs RRV Hsc70	2	0,217	0,023							

Tabla 9. Resumen del tratamiento estadístico por *t* de student no pareada para los resultados de la figura 2E. ELISA de captura PDI. N. representa el número total de datos; M. la media aritmética de los datos; SD la desviación estándar y S la significancia. Los ensayos fueron realizados por triplicado y el procedimiento se realizó al menos dos veces de manera independiente. Los valores se contrastan frente al control: fracciones de membrana con DLPs sin fármacos. La significancia se graficó de acuerdo con las siguientes convenciones: ns= P>0.05 (no significativo); * = P<0.05 (significativo); ** = P<0.01 (muy significativo); *** = P< 0.001 (altamente significativo).

DTNB [5 mM] disminuyó la unión rPDI-TLPs de rotavirus en un 50%, 45 % y 58% para TLPs Humanos wt, RRV y ECwt respectivamente (Tabla 12 y Fig. 3C). Esto sugiere que los grupos tiol están implicados en el proceso de unión de las partículas virales, específicamente PDI-rotavirus, aunque posiblemente rotavirus se una a otras regiones de PDI, como la región de unión a ligando b', unión independiente de la actividad reductora de PDI. Igualmente puede estar ocurriendo que no hay mayor inhibición por la baja concentración del fármaco aplicado.

Con NAC [60 mM] la inhibición fue del 47%, 60% y 76% para TLPs Humanos wt, RRV y ECwt respectivamente (Tabla 12 y Fig. 3C), sugiriendo que NAC por su naturaleza química forme puentes disulfuro con las cisteínas del motivo CGHC de PDI, apoyando que rotavirus requiere del motivo CGHC, en estado reducido, para su unión a PDI, sin descartar que NAC se una a otras regiones independientemente de la actividad reductora de PDI.

TRATAMIENTO	ABSORBANCIAS CAPTURA ROTAVIRUS					% INHIBICIÓN RELATIVO AL CONTROL				
	N	M	SD	p	S	N	M	SD	p	S
Bac [7.5mM] TLPs ECwt Cap Rota	2	0,2585	0,0262	0,0018	**	2	63	4,2426	0,0023	**
DTNB [30mM] TLPs ECwt Cap Rota	2	0	0	0,0001	***	2	100	0	0,0001	***
NEM [20mM] TLPs ECwt Cap Rota	2	0,1455	0,0389	0,0025	**	2	79	5,6569	0,0026	**
NAC [60mM] TLPs ECwt Cap Rota	2	0,152	0,1245	0,0249	*	2	78	18,385	0,0267	*
TLPs ECwt Captura Rota	2	0,7	0			2	0	0		
Bac [7.5mM] TLPs ECwt Cap PDI	2	0,405	0,0523	0,0154	*	2	34,5	17,678	0,1100	ns
DTNB [30mM] TLPs ECwt Cap PDI	2	0	0	0,0001	***	2	100	0	0,0001	***
NEM [20mM] TLPs ECwt Cap PDI	2	0,3295	0,0233	0,0020	**	2	52,5	3,5355	0,0023	**
NAC [60mM] TLPs ECwt Cap PDI	2	0,3915	0,0643	0,0211	*	2	43,5	9,1924	0,0216	*
TLPs ECwt Captura PDI	2	0,7	0			2	0	0		

Tabla 10. Resumen del tratamiento estadístico por t de student no pareada para los resultados de la figura 2F. ELISA de captura rotavirus. N. representa el número total de datos; M. la media aritmética de los datos; SD la desviación estándar y S la significancia. Los ensayos fueron realizados por triplicado y el procedimiento se realizó al menos dos veces de manera independiente. Los valores se contrastan frente al control: vellosidades intestinales con TLPs ECwt sin fármacos. La significancia se graficó de acuerdo con las siguientes convenciones: ns= P>0.05 (no significativo); *= P<0.05 (significativo); ** = P<0.01 (muy significativo); *** = P< 0.001 (altamente significativo).

Al bloquear con anticuerpos anti-PDI hecho en conejo en el laboratorio (dilución 1:1000) se observa una disminución del orden de 55%, 46% y 73% para TLPs Humanos wt, RRV y ECwt respectivamente (Tabla 12 y Fig. 3C). Ya que el bloqueo no es del 100%, sugiere que el virus compite con los anticuerpos por sitios de unión con PDI, desplazándolos probablemente porque rotavirus tiene igual o mejor afinidad por PDI que los anticuerpos, tal como el dominio de unión a ligando b' de PDI.

Al tratar la proteína rPDI con DTNB [5 mM] antes de incubar con las proteínas solubles de la capa externa VP7 y VP5 y de la capa intermedia VP6 o con DLPs de rotavirus, se obtuvo en todos los casos, reducciones en promedio de un 50% en la unión de rPDI, con respecto a cuando la rPDI no se trata con DTNB (Fig. 3C). El tratamiento de la rPDI con NAC [60 mM] o con anticuerpos anti-PDI también reduce esta unión, en valores que superan el 50% para todos los casos, excepto para DLPs de RRV donde la inhibición es del 40% (Tabla 12 y Fig. 3C).

En conjunto los datos obtenidos en el sistema libre de células, demuestran que PDI se une directamente a rotavirus, específicamente con las proteínas virales estructurales VP7, VP6 y VP5. Además se establece que afectar el estado redox o bloquear a PDI, afecta al menos

un 50% de la unión de PDI con TLPs de rotavirus, lo que sugiere que el estado redox es importante para y/o durante la unión entre PDI y rotavirus.

4.1.7 La superficie celular reductora genera cambios en la distribución de tioles en las proteínas estructurales del virus.

El que PDI se una o no a rotavirus podría ser circunstancial y no implica necesariamente que esta unión sea fisiológicamente funcional en el contexto del anclaje o internalización del virus. Por esto, se hace necesario evaluar cambios en las partículas virales una vez se unen a la membrana celular donde la actividad reductora de PDI está presente y compararla con una actividad de PDI inhibida por los agentes que bloquean el intercambio tiol-disulfuro DTNB y Bac. Inicialmente se pretendió determinar si los viriones (TLPs) presentan grupos SH libres (sulfidrilos) luego de activarlos, es decir, cuando la proteína VP4 se ha proteolíticamente dividido, generando los fragmentos VP5 y VP8 ó si se requiere de tratamiento con un agente reductor como el Ditiotreitól (DTT) que permite la reducción de los puentes disulfuro a grupos tiol. Para esto, TLPs de rotavirus Humanos wt activados con tripsina fueron tratadas inicialmente por 1 hora a 37°C con DTT [5 mM], posteriormente con maleimido biotinilado (MPB) por 30 minutos a temperatura ambiente, inmunoprecipitadas con un anticuerpo anti-rotavirus, corridas en una SDS-PAGE en condiciones reductoras y denaturantes y transferidas a membrana de PVDF. Se detectó los grupos SH que forman enlaces tio-éster estables con MPB mediante el reactivo estreptavidina-HRP.

En el virus activado con tripsina y tratado con DTT se observó bandas que por su ubicación y peso molecular aproximado corresponden a las proteínas virales estructurales de rotavirus (Fig. 4A, carriles 1-3). En cambio, para la misma concentración de TLPs Humanos wt activados con tripsina, que no fueron tratadas con DTT pero si con MPB, no se observó ninguna banda capturada por estreptavidina-HRP, sugiriendo que las TLPs Humanos wt no presentan ningún grupo SH libre disponible para ser captado por MPB y por consiguiente, los SH detectados son consecuencia del agente reductor DTT (Fig. 4A-carriles 4 y 5). El corte de VP4 por tripsina per se no induce la formación de grupos SH; en cambio, si se forman, independiente del corte con tripsina, apoyando que se requiere de un agente reductor (Fig. 4A-carriles 1-3) y (Fig. 4A-carriles 8-9). Este hallazgo coincide con trabajos previos que indican que las cisteínas de las proteínas virales estructurales de rotavirus conformacionalmente expuestas se encuentran formando puentes disulfuro (Patton, Hua et al. 1993; Dormitzer, Nason et al. 2004; Acosta, Calderon et al. 2009; Yoder, Trask et al. 2009; Aoki, Trask et al. 2011; Calderón, Guzmán et al. 2012).

SIN TRATAMIENTO					DTNB [5 mM]					
	N	MEDIA	SD		N	MEDIA	SD	p	S	
TLPs Humanos wt	2	0,90	0,29		2	0,48	0,39	0,3515	ns	
TLPs RRV	2	0,37	0,10		2	0,22	0,15	0,3524	ns	
DLPs RRV	2	0,21	0,01		2	0,14	0,02	0,0430	*	
DLPs RRV-Hsc70	2	0,31	0,00							
TLPs ECwt	2	0,43	0,00		2	0,19	0,00	0,0001	***	
DLPs ECwt	2	0,25	0,02		2	0,14	0,02	0,0326	*	
DLPs ECwt- Hsc70	2	0,56	0,15							
rVP5	2	0,68	0,03		2	0,48	0,00	0,0136	*	
rVP6	2	0,45	0,01		2	0,20	0,01	0,0032	**	
rVP6-Hsc70	2	1,12	0,06							
VP7	2	0,38	0,10		2	0,21	0,08	0,1903	ns	
rVP8	2	0,00	0,00		2	0,00	0,00			
	NAC [60mM]					Ac Anti-PDI [1:1000]				
	N	MEDIA	SD	p	S	N	MEDIA	SD	p	S
TLPs Humanos wt	2	0,49	0,27	0,2799	ns	2	0,44	0,35	0,2902	ns
TLPs RRV	2	0,15	0,10	0,1659	ns	2	0,21	0,10	0,2470	ns
DLPs RRV	2	0,07	0,02	0,0098	**	2	0,12	0,01	0,0145	*
DLPs RRV-Hsc70										
TLPs ECwt	2	0,10	0,00	0,0001	***	2	0,12	0,00	0,0001	***
DLPs ECwt	2	0,11	0,03	0,0399	*	2	0,05	0,03	0,0160	*
DLPs ECwt- Hsc70										
rVP5	2	0,23	0,07	0,0150	*	2	0,39	0,04	0,0175	*
rVP6	2	0,12	0,04	0,0088	**	2	0,24	0,07	0,0592	ns
rVP6-Hsc70										
VP7	2	0,21	0,13	0,2796	ns	2	0,11	0,09	0,1059	ns
rVP8	2	0,00	0,00			2	0,00	0,00		

Tabla 11. Resumen del tratamiento estadístico por t de student no pareada para los resultados de la figura 3B. ELISA de captura indirecto. N. representa el número total de datos; M. la media aritmética de los datos; SD la desviación estándar y S la significancia. Los ensayos fueron realizados por triplicado y el procedimiento se realizó al menos dos veces de manera independiente. Los valores se contrastan frente al control: rPDI sola. La significancia se graficó de acuerdo con las siguientes convenciones: ns= P>0.05 (no significativo); *= P<0.05 (significativo); ** = P<0.01 (muy significativo); *** = P< 0.001 (altamente significativo).

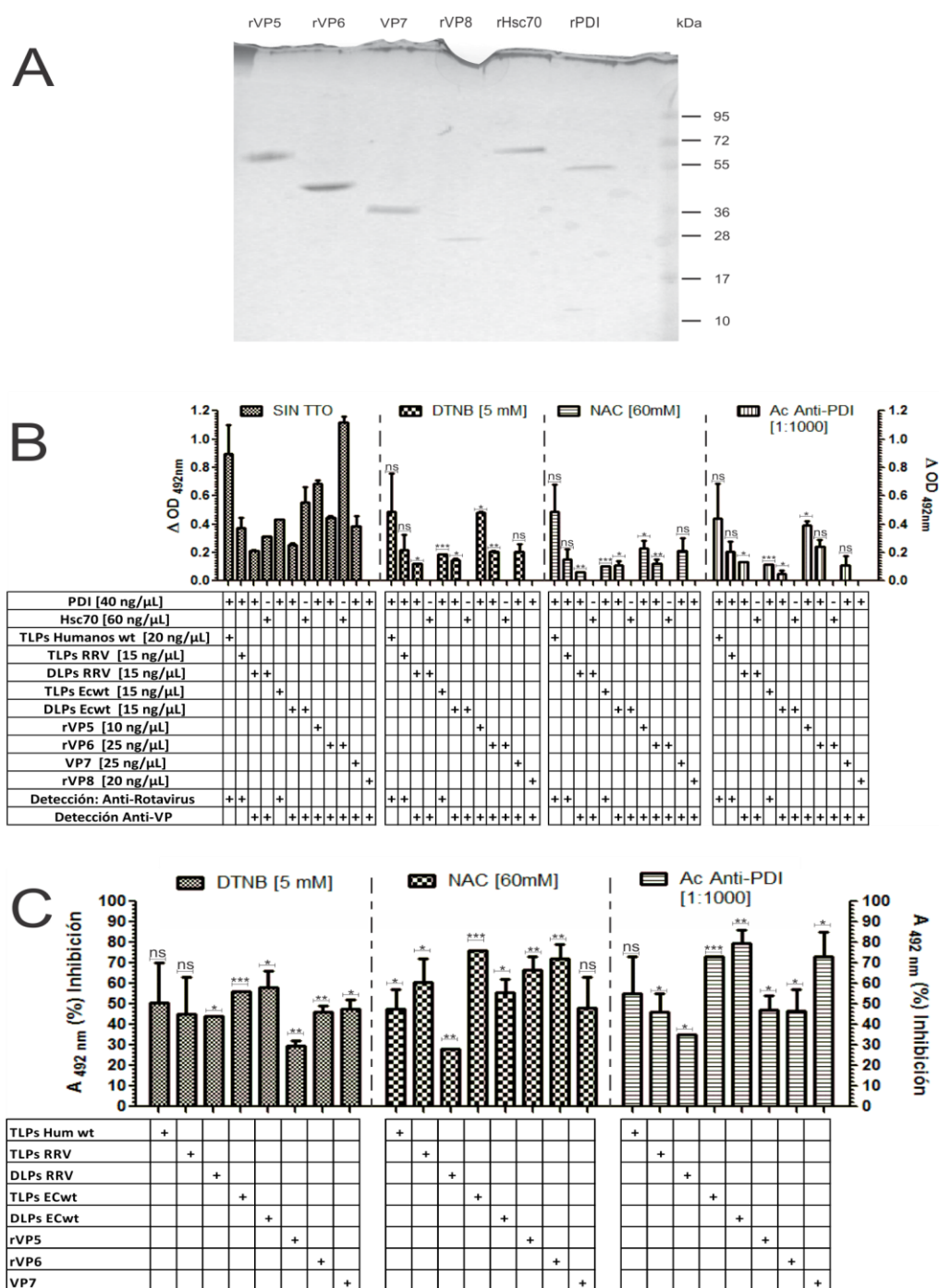


Fig. 3. Unión e inhibición de la interacción PDI-rotavirus en sistema libre de células. A. Tinción con plata de proteínas purificadas trabajadas en el sistema libre de células. Concentraciones fijas de proteínas purificadas: rPDI [216.6 ng/μL], rVP5 [129,2 ng/μL], rVP6 [62,0 ng/μL], rVP8 [178,6 ng/μL], rHsc70 [130 ng/μL] y VP7 [150 ng/μL] fueron tratadas bajo condiciones reductoras y denaturantes, corridas en una SDS-PAGE y sobre el gel se realizó una tinción con plata. B. ELISA indirecto de la unión e inhibición de interacción TLPs-PDI, DLPs-PDI y rVPs-rPDI por acción de fármacos que alteran la actividad redox. rPDI es tratada o no con DTNB, NAC o anti-PDI por 1 h a 37 °C previo a la incubación in vitro con TLPs, DLPs o VPs de rotavirus. ΔDO: resulta de la diferencia de la absorbancia promedio obtenida para los experimentos menos la absorbancia

de los controles negativos. C. % de inhibición de interacción PDI-rotavirus. Los ensayos fueron realizados por triplicado y el procedimiento se realizó al menos dos veces de manera independiente. Las barras de error representan la desviación estándar (SD) de al menos dos experimentos independientes realizados por triplicado. La significancia se graficó de acuerdo con las siguientes convenciones: ns= $P > 0.05$ (no significativo); * = $P < 0.05$ (significativo); ** = $P < 0.01$ (muy significativo); *** = $P < 0.001$ (altamente significativo).

Para analizar si lo hallado con el ambiente reductor, simulado por DTT, ocurre cuando se incuba el rotavirus con la membrana celular, se utilizó inicialmente el modelo celular MA104. En este caso, las células MA104 se trataron o no con agentes impermeables a la membrana celular como Bac [7,5 mM] y DTNB [7,5 mM], se lavaron y se incubaron con TLPs RRV. Luego, las células fueron incubadas con MPB por 30 minutos a temperatura ambiente, lavadas, lisadas, inmunoprecipitadas con un anticuerpo anti-rotavirus, corridas en una SDS-PAGE (cargando en cada pozo todo lo inmunoprecipitado: perlas, anticuerpos y lo precipitado), electrotransferidas a membrana de PVDF y tratadas con HRP-estreptavidina.

Para las TLPs de RRV incubadas con MA104 y luego con MPB, se observó 5 bandas, 4 de las cuales, por su peso molecular podrían corresponder a las proteínas virales VP2, VP4, VP6 y VP7 de rotavirus (Fig. 4B-carril 3). Sin embargo, estas bandas no se observan cuando se bloquea la actividad reductora de la membrana celular de MA104 con los agentes impermeables Bac [7,5 mM] y DTNB [7,5 mM] (Fig. 4B-carril 1 y 2 respectivamente). En uno de los controles (MA104 sin TLPs de RRV pero con MPB, Fig. 4B-carril 4) se observa una banda al igual que en los carriles 2 y 3, sugiriendo que pertenece a una proteína celular y no al virus. Probablemente la proteína se vino adherida a las perlas, puesto que se adicionó al gel SDS-PAGE todo el contenido.

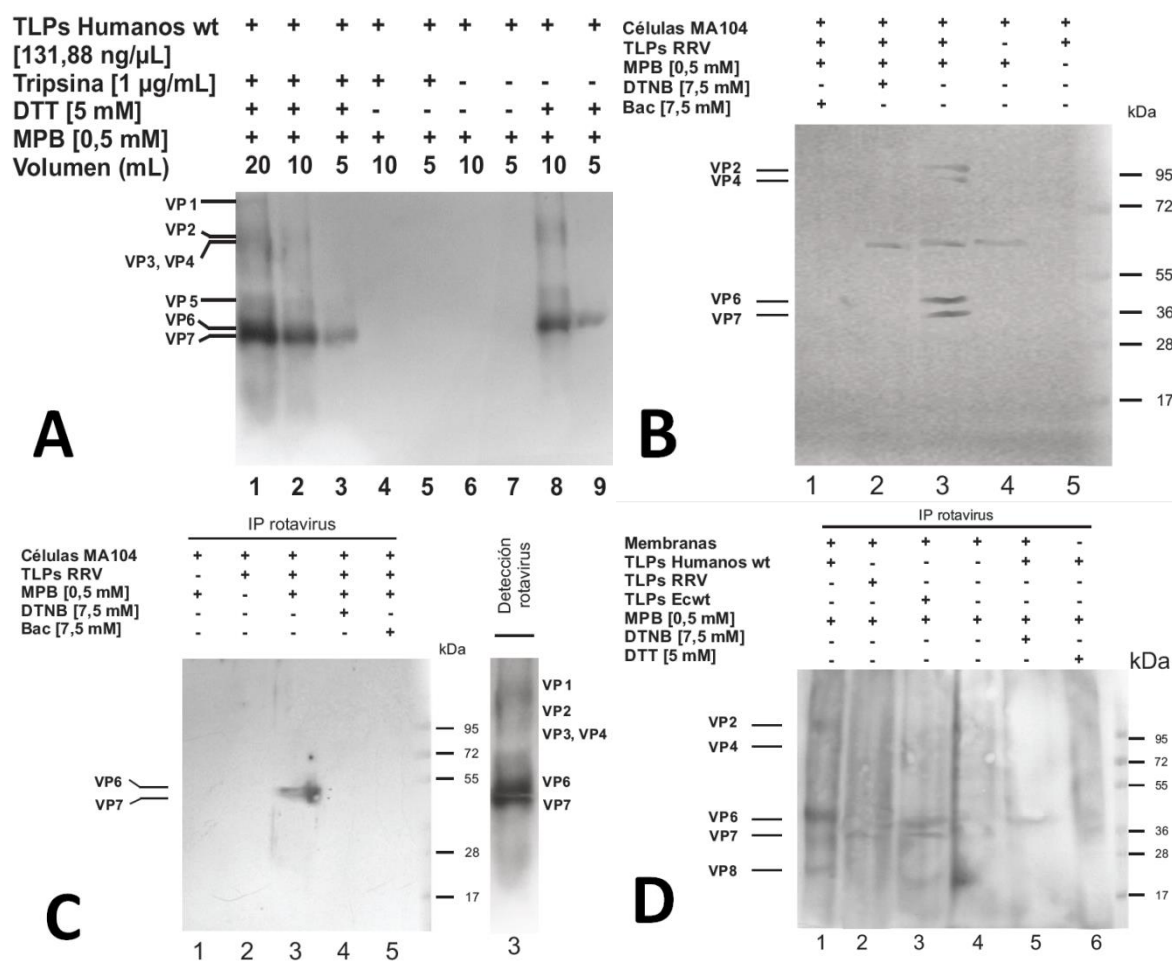


Fig. 4. La superficie celular reductora genera cambios en la distribución de tioles en las proteínas estructurales del virus. A. TLPs de rotavirus no presentan grupos SH libres. TLPs Humanos wt fueron expuestas a tratamiento con DTT y MPB, posterior inmunoprecipitación de rotavirus, SDS-PAGE en condiciones reductoras y denaturantes y western blot en la que detectan mediante HRP-estreptavidina, sulfidrilos de proteínas estructurales rotavirales unidas a MPB. B-D. La superficie celular de MA104 (B y C) o de fracciones enriquecidas de membrana celular de vellosidades intestinales de ratón ICR adulto (D) fueron tratadas o no con agentes que bloquean el intercambio tiol-disulfuro DTNB y/o Bac por 1 hora a 37°C y posterior inoculación de TLPs Humanos wt, RRV o ECwt con MPB por 1 hora todo a 4°C, las muestras fueron tratadas bajo el mismo protocolo que en A. En C. la membrana fue tratada para retirar HRP-estreptavidina y reutilizada para detección de proteínas estructurales rotavirales.

Para descartar esto, se repitió el experimento anterior, pero la muestra precipitada se hirvió en presencia de buffer Leammli, se centrifugó y solamente se tomó el sobrenadante, excluyendo las perlas. Se encontró que las células incubadas con TLPs de rotavirus y con MPB, presentan dos bandas que por el peso molecular podrían corresponder a las proteínas virales VP6 y VP7 (Fig. 4C-carril 3). Estas bandas no se observan cuando se bloquean la actividad reductora de la membrana celular de MA104

con agentes impermeables DTNB y Bac (Fig. 4C-carril 4 y 5). En los controles (MA104 sin RRV pero con MPB, o MA104 con RRV pero sin MBP Fig. 4C-carril 1,2) no se observan bandas apoyando que la banda observada en los carriles 2, 3 y 4 de la Fig. 4B pertenece a una proteína celular y no al virus, que probablemente se adhiere a las perlas.

A la membrana de la figura 4C se le retiraron la HRP-estreptavidina utilizada Mediante limpieza de la membrana de la figura 4C, y de nuevo se incubó la membrana con anticuerpos anti-rotavirus y luego con un anticuerpo secundario conjugado con HRP. Para el mismo carril 3 de la figura 4, se puede observar la presencia de todas las proteínas rotavirales. Al comparar las bandas del carril 3 analizadas para HRP-estreptavidina con respecto a las bandas obtenidas para rotavirus se puede precisar que las dos bandas obtenidas por inmunoprecipitación corresponden a las proteínas VP6 y VP7 de rotavirus.

Se repitió el experimento con el protocolo de la figura 4C pero utilizando fracciones enriquecidas de membrana citoplasmática extraídas de vellosidades intestinales aisladas de ratón ICR adulto e incubadas con TLPs de rotavirus RRV [80 ng/μl], Humanos wt [131,88 ng/μl] o ECwt [100 ng/μl] y posteriormente con MPB e inmunoprecipitadas con anticuerpos anti-rotavirus, se observaron dos bandas en los carriles 1-3 que, de acuerdo con las obtenidas en el carril 6 en donde se corrieron TLPs de rotavirus Humanos wt en presencia de DTT y MPB, corresponden a las proteínas virales VP6 y VP7. En el control (membranas incubadas con MPB) no se observa la banda generada al inmunoprecipitar con anti- rotavirus (Fig. 4D-carril 4). Igualmente, no se observa la banda que corresponde a VP7 cuando las fracciones son incubadas con DTNB [7,5 mM], hallazgo que coincide con las figuras 4B y 4C (Fig. 4D-carril 5), pero no desaparece la banda a la altura de VP6, quizá porque en las vellosidades los rotavirus se unen a diferentes moléculas celulares que no se ven afectadas al alterar el intercambio tiol-disulfuro, aspecto ya analizado anteriormente.

PORCENTAJE DE INHIBICIÓN RELATIVO AL CONTROL															
DTNB [5 mM]						NAC [60mM]					Ac Anti-PDI [1:1000]				
	N	MEDIA	SD	p	S	N	MEDIA	SD	p	S	N	MEDIA	SD	p	S
TLPs Humanos wt	2	50,5	27,58	0,1223	ns	2	47,5	13,44	0,0377	*	2	55	25,46	0,0925	ns
TLPs RRV	2	45	25,46	0,1296	ns	2	60,5	16,26	0,0343	*	2	46	12,73	0,0362	*
DLPs RRV	2	35,5	7,78	0,0232	*	2	65	7,07	0,0059	**	2	41	8,49	0,0208	*
TLPs ECwt	2	56	0,00	0,0001	***	2	76	0,00	0,0001	***	2	73	0,00	0,0001	***
DLPs ECwt	2	58	11,31	0,0185	*	2	55,5	9,19	0,0134	*	2	79,5	9,19	0,0066	**
rVP5	2	29,5	3,54	0,0071	**	2	66,5	9,19	0,0094	**	2	47	9,90	0,0215	*
rVP6	2	46	4,24	0,0042	**	2	72	9,90	0,0093	**	2	46,5	14,85	0,0474	*
VP7	2	47,5	6,36	0,0089	*	2	48	21,21	0,0853	ns	2	73	16,97	0,0260	*

Tabla 12. Resumen del tratamiento estadístico por t de student no pareada para los resultados de la figura 3C. ELISA de captura indirecto. N. representa el número total de datos; M. la media aritmética de los datos; SD la desviación estándar y S la significancia. Los ensayos fueron realizados por triplicado y el procedimiento se realizó al menos dos veces de manera independiente. Los valores se contrastan frente al control: rPDI sin fármacos con TLPs, DLPs o VPs. La significancia se graficó de acuerdo con las siguientes convenciones: ns= P>0.05 (no significativo); *= P<0.05 (significativo); ** = P<0.01 (muy significativo); *** = P< 0.001 (altamente significativo).

Otro hallazgo al trabajar con TLPs Humanos wt y con ECwt en fracciones enriquecidas de membrana celular es la aparición de otra banda que podría corresponder conforme a su ubicación a VP8, además de una banda en TLPs Humanos wt que comprende a VP2, VP3 y VP4 (Fig. 4D-carriles 1 y 3).

En conjunto, los hallazgos sugieren que un ambiente reductor, facilita cambios conformacionales o remodelamientos por intercambio tiol-disulfuro en las proteínas virales mencionadas. Según resultados previos expuestos en el marco de referencia, tanto DTNB como Bac bloquean el intercambio tiol-disulfuro y reducen significativamente la infectividad de rotavirus en la línea celular MA104 (Calderón 2010; Calderon, Guerrero et al. 2012). Es probable que la explicación de este evento radique al menos en parte en inhibir la formación de tioles en las proteínas virales de la capa externa e intermedia de rotavirus y seguramente esta serie de cambios sean factores bioquímicos determinantes durante la internalización de rotavirus a la célula.

4.2 DISCUSIÓN

En el laboratorio de Biología molecular de virus se han hecho avances significativos en el esclarecimiento de los mecanismos de entrada de rotavirus a la célula. Al respecto, se ha evaluado la interacción de diferentes moléculas receptoras de la superficie celular como la integrina $\alpha\beta3$, Hsc70 y PDI con la entrada del virus (Guerrero, Zarate et al. 2000; Mayorga, Rubio et al. 2010; Calderón, Guerrero et al. 2011; Guerrero and Moreno 2012; Guerrero, Murillo et al. 2012; Santana, Guerrero et al. 2013) estableciendo que la infectividad de rotavirus es significativamente reducida cuando se altera el intercambio tiol-disulfuro o cuando las células se pre-incubaban con anticuerpos anti-Hsc70 y anti- PDI en diferentes modelos celulares (Guerrero, Zarate et al. 2000; Arias, Isa et al. 2002; Guerrero, Calderón et al. 2008; Acosta, Calderon et al. 2009; Calderón 2010; Mayorga, Rubio et al. 2010; Santana, Guerrero et al. 2013).

Los hallazgos de reducción de infectividad viral por Ac anti-PDI y de moléculas impermeables a membrana celular como DTNB y Bac que actúan alterando el intercambio tiol disulfuro, sumando a la evidencia que la rPDI se une directamente a las proteínas virales estructurales rVP5 y rVP6 permitieron sugerir a PDI como candidata a co-receptora durante la internalización de rotavirus a la célula. La evidencia previa respalda la hipótesis que un ambiente reductor en membrana celular provisto por moléculas como PDI u otra con dominios tipo tioredoxina como la integrina $\alpha\beta3$ sería importante durante la internalización de rotavirus.

Esta hipótesis ya ha sido demostrada en otros contextos celulares en donde PDI media la reducción de puentes disulfuro al interactuar con el receptor de la toxina de difteria para facilitar el transporte del fragmento tóxico hacia el citoplasma (Gallina, Hanley et al. 2002) o en diversos virus, como el sindbis virus, virus de inmunodeficiencia humana tipo 1 (HIV-1), poliomavirus (Py), virus de la enfermedad del Newcastle (NDV), papiloma virus humano (HPV), virus de leucemia murina (MLV), entre otros, en los que la infectividad viral parece depender de la actividad reductora de la superficie celular, indicando así que la PDI de superficie celular es requerida durante el proceso de entrada (Gallina, Hanley et al. 2002; Wallin, Ekstrom et al. 2004; Ishii, Kondo et al. 2007; Jain, McGinnes et al. 2007; Schelhaas, Malmstrom et al. 2007; Reiser, Francois et al. 2012).

La unión directa entre PDI-rotavirus no se había esclarecido y se desconoce si la reducción en la infectividad viral descrita arriba era consecuencia de una disminución en la entrada de la partícula viral promovida por el bloqueo de PDI.

Este trabajo evaluó la interacción y la actividad redox de superficie celular con TLPs de rotavirus Humanos wt, ECwt y RRV durante etapas tempranas de internalización del virus en un modelo de vellosidades intestinales de ratón ICR adulto. Resultados previos de nuestro laboratorio mostraron que PDI se encuentra presente en microdominios lipídicos Rafts de la superficie celular de líneas celulares MA104 y de vellosidades intestinales de ratón ICR junto a otras moléculas ya caracterizadas como co-receptoras de rotavirus como la integrina $\alpha\beta 3$ y Hsc70 (Calderón 2010; Gómez 2013; Santana, Guerrero et al. 2013), por lo que el modelo celular se ajustó para determinar si existe o no unión entre PDI de membrana y rotavirus.

La interacción entre rotavirus y la Hsc70 ha sido ampliamente documentada y se sabe que ocurre en un evento subsiguiente a la unión del virus a la célula. Se ha sugerido que la interacción de Hsc70 con TLPs en solución parece producir cambios conformacionales en VP5 aunque se sabe que Hsc70 interacciona con secuencias de aminoácidos de VP5 y VP6 (Arias, Isa et al. 2002) (Acosta, Calderon et al. 2009), estos criterios permitieron utilizar a Hsc70 como control experimental durante los ensayos de interacción PDI-rotavirus.

Los resultados expuestos en esta investigación permiten caracterizar en un modelo no estudiado a la fecha (fracciones enriquecidas de membrana de vellosidades intestinales de ratón ICR adulto) la interacción y asociación funcional entre PDI y rotavirus, indicando que independientemente del método utilizado (ELISAS de captura para rotavirus y para PDI) se presenta unión entre cada una de las TLPs de rotavirus y PDI de vellosidades intestinales aisladas de ratón ICR adulto y de fracciones de membrana aisladas a partir de estas vellosidades durante los eventos iniciales del ciclo viral. (Fig. 1B-C) La participación de PDI

durante la unión a rotavirus se evaluó bloqueando a PDI con Ac anti-PDI fracción F(ab')₂ previo a su incubación con TLPs de rotavirus en el mismo modelo celular, arrojando reducciones de hasta un 85% de la unión PDI-rotavirus (Fig. 1F). Es interesante que esta reducción en la unión no logre reducir la infectividad viral en valores cercanos (Calderón 2010; Calderón, Guerrero et al. 2011; Calderón, Guzmán et al. 2012; Calderon, Guerrero et al. 2012), lo que implicaría que si bien la unión PDI-rotavirus es importante para o durante la internalización del virus, no es excluyente de otras moléculas o de otras vías celulares de entrada.

La co-inmunoprecipitación de PDI con TLPs de rotavirus después de sólo 5 minutos de contacto entre el virus con la superficie celular apoya los resultados anteriores sugiriendo una unión rotavirus-PDI bien sea directa o mediada por un complejo proteico (Fig. 1D-E).

Ya en el modelo libre de células, los resultados revelaron que TLPs, DLPs y proteínas purificadas rVP5, rVP6 y VP7 se unen directamente a rPDI. Bajo las condiciones dadas, fue posible establecer que existe una interacción física directa entre PDI y rotavirus y sugiere que esta asociación física posiblemente sea la presentada en las condiciones celulares arriba citadas, donde PDI de membrana citoplasmática se une al virus (Fig 3A). Esta unión de rPDI y las proteínas virales solubles ya se había descrito (Moreno 2010; Moreno, Guerrero et al. 2013), sin embargo, no se había detallado la unión entre rPDI y TLPs o DLPs de rotavirus en donde las proteínas estructurales virales presentan su conformación funcional.

Con el objetivo de identificar si el intercambio tiol-disulfuro es condicionante de la interacción rotavirus-célula, se dispuso de 4 agentes farmacológicos ampliamente conocidos por su capacidad de afectar el intercambio tiol-disulfuro y por ende con la actividad reductora celular que compromete a PDI. Los resultados de las figuras 2 y 3 mostraron que el pre-tratamiento de vellosidades intestinales, de fracciones de membrana o directamente de la rPDI con DTNB, Bac, NAC o NEM disminuye la unión entre PDI-rotavirus.

Es posible que Bac efectuara su inhibición compitiendo por el dominio b' que corresponde al sitio de unión a sustrato, generando puentes disulfuro entre el tiol del anillo tiazolina de la Bac y cisteínas de PDI (Dickerhof, Kleffmann et al. 2011) (Hatahet and Ruddock 2009). El que Bac afecte la actividad reductora de PDI sugiere que esta función podría ser importante durante la unión PDI-rotavirus (Karala and Ruddock 2010). Aunque no se debe descartar que el efecto observado sea consecuencia de la inhibición de la función chaperona de PDI por parte de Bac.

En los diferentes ensayos donde se utilizó DTNB, se observó una tendencia de inhibición tipo dosis-dependiente por parte del fármaco. DTNB no es inhibidor específico de PDI, pero tiene la capacidad de inhibir sus actividades oxido-reductoras por unión al sitio activo (Gowthaman, Jayakanthan et al. 2008). Su inhabilidad para atravesar la membrana celular sugiere que el efecto inhibitorio neto por parte del fármaco radicó en alterar el estado reductor de la membrana celular y por ende, la reducción de la unión PDI-rotavirus es consecuencia de afectar los tioles libres de membrana incluyendo los presentes en PDI. Si afectar el estado redox de membrana afecta la unión PDI-rotavirus, entonces se puede sugerir que el estado redox asociado a grupos tioles de membrana es importante para o durante la unión PDI-rotavirus.

NEM al igual que DTNB se une a tioles y también mostró capacidad de inhibir la unión PDI-rotavirus aunque en menor grado que DTNB (Fig. 2); es probable que la exposición de tioles no sea el único condicionante para esta interacción. Igualmente, que NEM haya permeado la superficie celular y esta sea la explicación a la inhibición menor de NEM frente a DTNB y al no utilizar otras concentraciones de NEM no se descarta que la concentración utilizada no hubiese sido la suficiente para lograr mayor efecto inhibitorio.

NAC en concentraciones cercanas a [50-80 mM] no afecta la viabilidad celular pero si produce una reducción de hasta un 80% en la infectividad de rotavirus (Guerrero, Murillo et al. 2012; Guerrero, Paula Pardo et al. 2013) y en este trabajo se mostró que [60 mM] de NAC inhibe la unión de PDI-rotavirus. Es posible que NAC por su naturaleza química aparte de afectar el estado redox a nivel intracelular, también reaccione con los tioles expuestos en la superficie de membrana, que incluye a PDI, afectando la unión con rotavirus.

Los resultados obtenidos en la figura 2F revelan un desplazamiento del 50% en la unión PDI-rotavirus al incubar las vellosidades intestinales con los fármacos y luego con TLPs de rotavirus, sugiriendo un alto grado de especificidad y/o afinidad entre PDI-rotavirus. Se ha sugerido que DTNB al contacto directo con TLPs afecta directamente la estabilidad de la partícula, provocando el desensamblaje de la misma (Calderón 2010). Lo anterior explicaría en parte el efecto global de inhibición del 100% en la unión y sugeriría que la conformación espacial de la partícula rotaviral es importante durante la unión PDI-rotavirus.

En síntesis, existe una tendencia de inhibición que supera el 50 % para los diferentes tratamientos exceptuando DTNB 5 mM (Tabla 8), sugiriendo que estado reductor es importante aunque no es el único condicionante de la interacción PDI-rotavirus.

Por último, se determinó que un ambiente reductor durante la interacción rotavirus-célula modifica el patrón electroforético de la partícula viral asociada a exposición de grupos sulfidrido (Fig. 4B-D). Mediante el sistema DTT-MPB (Fig. 4A) se estableció que las TLPs de rotavirus, sin contacto con las células, no presentan grupos tioles expuestos. El hallazgo fue consistente con reportes previos donde se establece que las cisteínas de las proteínas virales estructurales de rotavirus conformacionalmente expuestas se encuentran formando puentes disulfuro y que tan sólo VP7 los estaría exponiendo, cuando establece contacto con proteínas celulares (Patton, Hua et al. 1993; Dormitzer, Nason et al. 2004; Acosta, Calderon et al. 2009; Yoder, Trask et al. 2009; Aoki, Trask et al. 2011; Calderón, Guzmán et al. 2012).

Ahora bien, si un ambiente reductor simulado por DTT genera tioles en TLPs de rotavirus, entonces, la exposición de rotavirus al ambiente reductor de la membrana celular donde están presentes proteínas como PDI, o similares, podría generar cambios en la distribución de SH libres de la partícula viral. Al evaluar esta hipótesis se comprobó que el ambiente reductor de las células MA104 o de las fracciones enriquecidas de membrana celular aisladas de vellosidades intestinales de ratón ICR adulto también genera tioles en las proteínas VP6 y VP7 de rotavirus (Fig. 4B-D). Nuevamente, al bloquear el estado reductor con DTNB y Bac en los modelos celulares citados, se impide la formación y exposición de tioles en la partícula viral.

Este hallazgo no se había descrito anteriormente y sugiere que el intercambio tiol-disulfuro es un factor bioquímico condicionante durante la interacción de rotavirus con la membrana celular, sin desconocer otros determinantes implicados en el evento tales como la cepa viral, el tiempo de exposición, concentración viral, la naturaleza del medio de suspensión y las interacciones entre la TLP y otras co-receptoras (Alexander, Manvell et al. 1997).

Las cisteínas de VP7 deben oxidarse durante el ensamblaje del virión al interior del RE (Svensson, Dormitzer et al. 1994). Es posible que para o durante el proceso de entrada de la TLPs al enterocito o a la célula MA104 se requiera de un proceso contrario de reducción de puentes disulfuro en la VP7 que genere cambios conformacionales en la TLP y permita el desensamblaje del virión a DLP. Los resultados de exposición de sulfidrilos en VP7 para las tres cepas rotavirales analizadas (Fig. 4) aportan evidencia de reacciones de intercambio tiol-disulfuro de reducción por parte de membranas celulares sobre VP7, posiblemente sobre el puente disulfuro expuesto a solvente (196-207). Este puente disulfuro de VP7 podría ser blanco de PDI de membrana o de la integrina $\alpha V\beta III$ quien presenta dominios tipo tioredoxina (CXXC) y se encuentra formando complejos con PDI y

partículas rotavirales (Arias, Isa et al. 2002; Swiatkowska, Szymanski et al. 2008; Mayorga, Rubio et al. 2010; Calderon, Guerrero et al. 2012).

Como se ha indicado con otros virus, como el virus de la enfermedad del Newcastle, el intercambio tiol-disulfuro genera un remodelamiento funcional en las proteínas implicadas en la internalización de la partícula viral, paso decisivo en la infectividad viral, que limita la entrada del virus al huésped (Jain, McGinnes et al. 2007; Jain, McGinnes et al. 2009). En la secuencia de eventos durante la internalización de rotavirus se requiere de remodelamiento de la partícula viral y este evento se hace necesaria la actividad reductora ejecutada por moléculas con actividad oxido-reductora, como PDI de membrana, para facilitar el intercambio tiol-disulfuro y los resultados de la figura 4 soportan esta idea.

Esta evidencia amplía el enfoque de lo sugerido por Aoki et al., respecto de la relevancia de los puentes disulfuro en VP7 en el contexto de ciclo viral. Según resultados, la estructura trimérica de VP7 mediada por cationes divalentes como el Ca^{2+} , podría ser estabilizada por los disulfuros cuando la concentración de Ca^{2+} es reducida (como por ejemplo en la vesícula endocítica) (Aoki, Settembre et al. 2009; Aoki, Trask et al. 2011). La evidencia presentada en este trabajo sugiere que puentes disulfuro en VP7 se estarían formando durante la internalización de la partícula viral y que esta redistribución de grupos tiol es también determinante para la infectividad viral.

Si bien, las tioredoxina presentan una distribución ubicua en la célula, algunas reacciones reductoras ocurren con mayor eficiencia con miembros de la familia de PDI, los cuales a pesar de su similitud de sitios activos con las tioredoxinas, presentan una ventaja de interacción enzima-sustrato en la reducción de un puente disulfuro particular, esta ventaja daría peso a la posibilidad que sea PDI de la superficie celular y no tioredoxinas quien catalice las reducciones descritas en la figura 4 aunque ambas estén presentes en la misma localización.

CAPÍTULO 5

5.1 CONCLUSIÓN

Vellosidades intestinales completas, fracciones enriquecidas de membrana aisladas de vellosidades intestinales y PDI soluble se unen a tres cepas de TLPs de rotavirus, esta unión está condicionada al intercambio tiol-disulfuro de PDI o de moléculas con homología funcional y al estado reducido de la superficie celular, puesto que genera cambios en la distribución de tioles en las proteínas estructurales del virus VP6 y VP7 y menos concluyente en VP4.

5.2 PROYECCIONES DE LA INVESTIGACIÓN

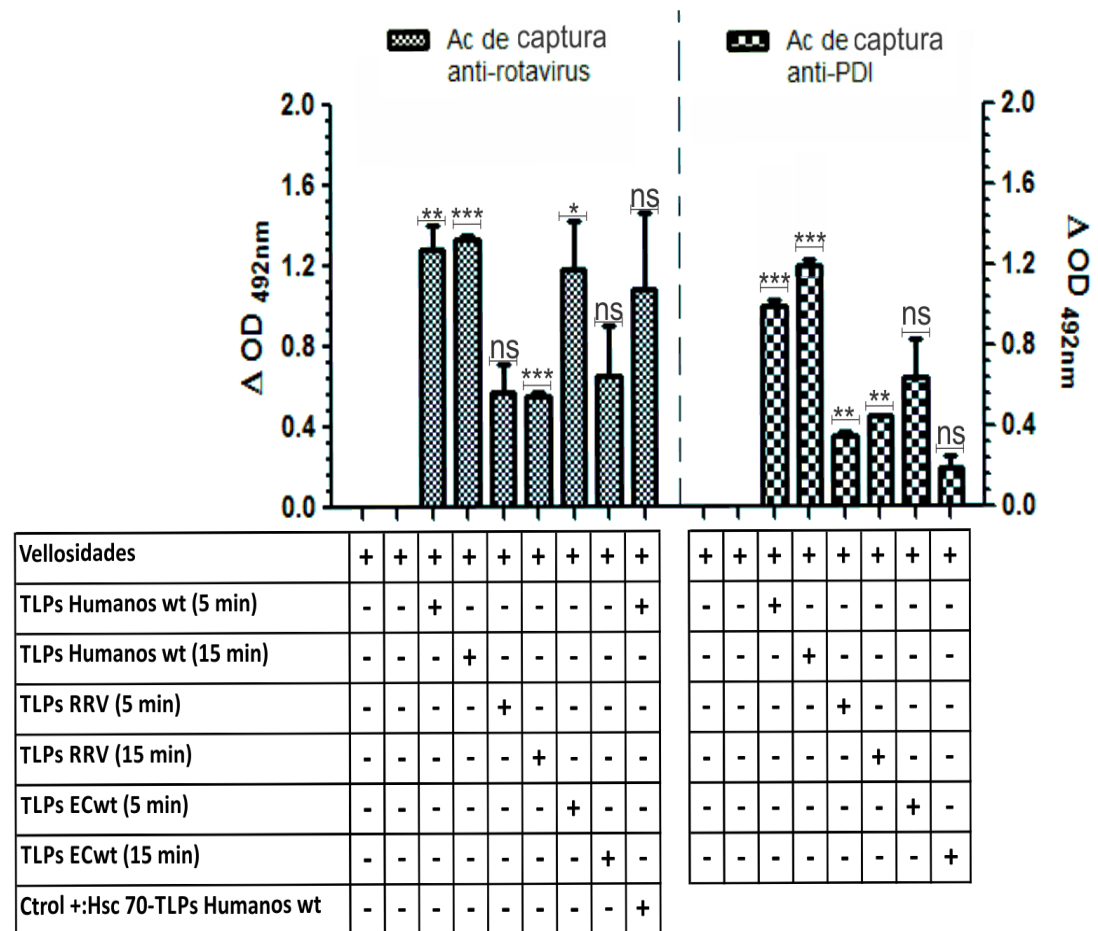
Los reportes previos a este trabajo reportan disminuciones de la infectividad viral cuando las células son expuestas a moléculas que alteran el intercambio tiol-disulfuro, sin embargo, estos estudios aunque muestran alguna evidencia de unión PDI-rotavirus en modelos libres de células o en lisado de células MA104, no esclarecen si PDI esta implicada durante la internalización del virus, ni tampoco si la reducción en la infectividad se debe a una reducción en la unión entre rotavirus y PDI.

Este estudio aportó evidencia en cuanto al remodelamiento estructural de rotavirus durante su internalización como un factor implicado en el ciclo infeccioso. Igualmente, aportó conocimiento sobre fármacos que inhiben la infectividad viral desde la misma internalización de rotavirus. Los resultados demuestran la interacción funcional condicionada al estado redox en un modelo que no había sido utilizado para la evaluación de la interacción PDI-rotavirus, fracciones enriquecidas de membrana extraídas de vellosidades intestinales aisladas de ratón ICR adulto.

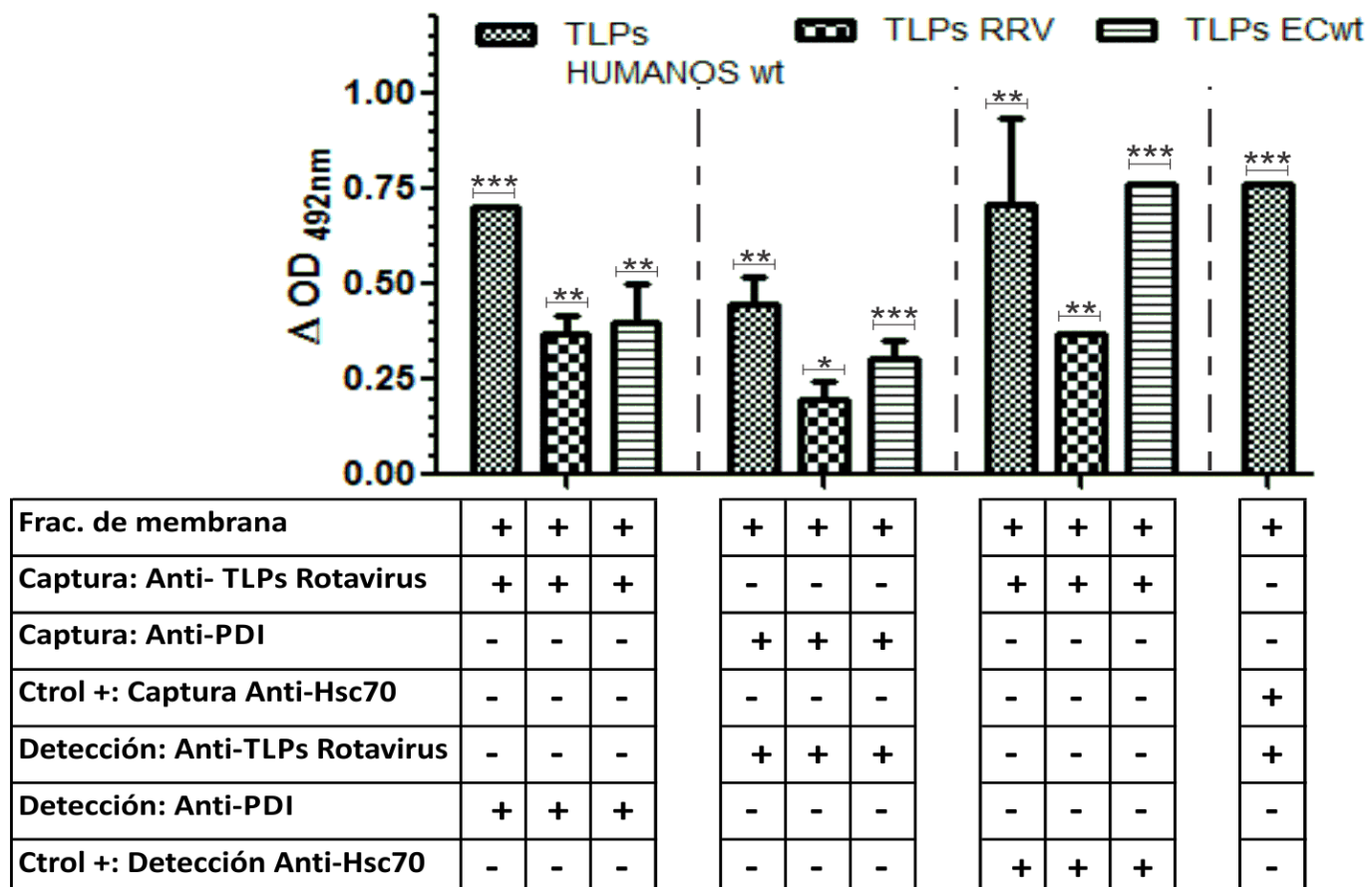
Si bien, el conjunto de hallazgos permite relacionar a PDI con rotavirus durante la entrada del virus, no permite establecer el grado de especificidad, saturabilidad y de afinidad de esta unión.

Aun queda pendiente por esclarecer si en el modelo estudiado NAC afecta la estequiometría y estado redox de PDI de superficie celular. De ser así, este aminoácido modificado actuaría de forma directa e indirecta para provocar la disminución en la unión PDI-rotavirus. De forma directa al unirse a tioles expuestos en la membrana celular e indirectamente al alterar el estado redox y favorecer una disminución en la exposición de PDI de membrana.

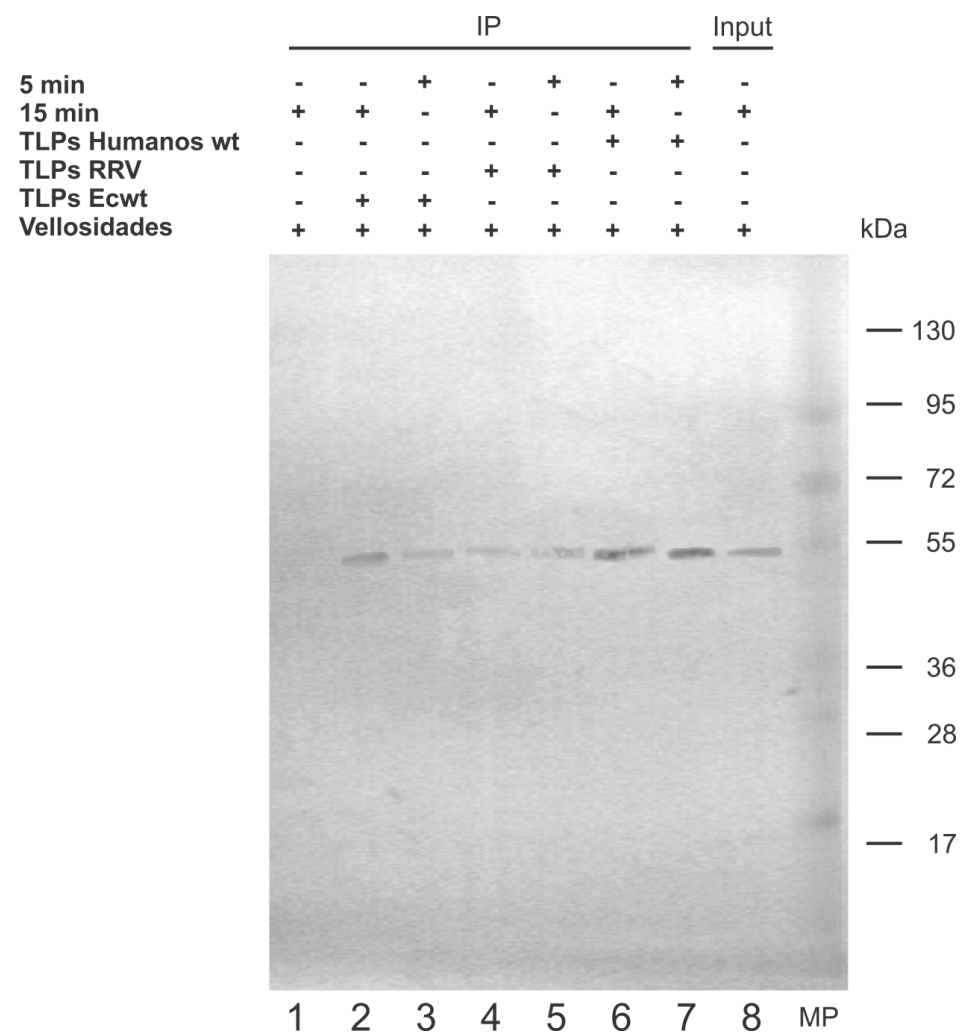
Aunque los hallazgos obtenidos plantean la posibilidad de una interacción funcional en la que PDI podría intervenir como Co-receptora durante la internalización de la partícula viral, no excluye que otras moléculas con actividad oxido-reductora, tales como proteínas tipo tioredoxina o las mismas integrinas medien dichos los cambios conformacionales directamente sobre las proteínas virales estructurales y sea PDI la proteína intermediaria durante la renovación de la actividad reductora de estas proteínas. Es necesario exponer la rPDI directamente con las TLPs y evaluar si la rPDI genera los remodelamientos en la partícula viral. Aún está por esclarecer como la asociación funcional entre PDI y rotavirus se correlaciona con las otras co-receptoras del virus durante la internalización.



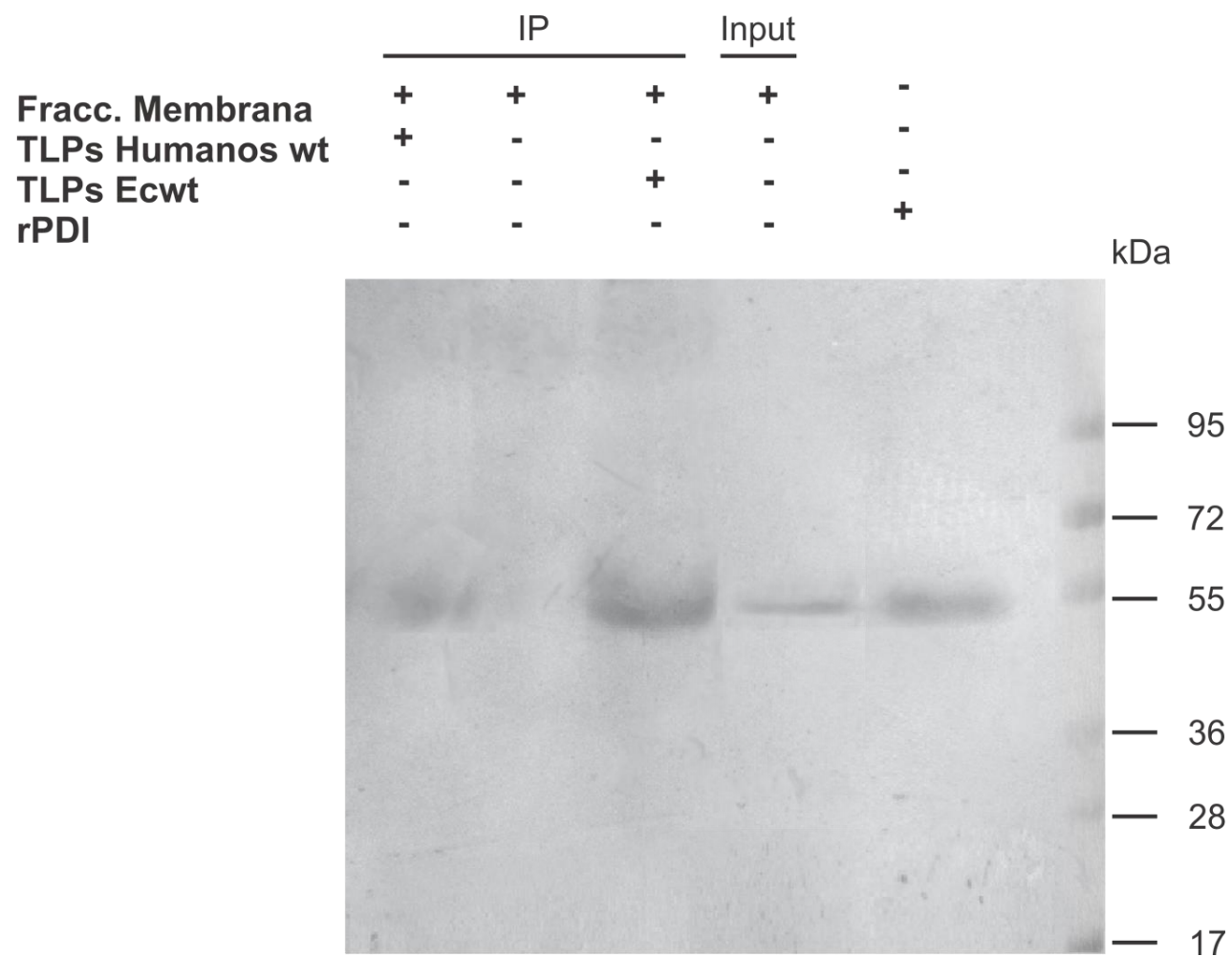
ANEXO A. FIGURA 1B



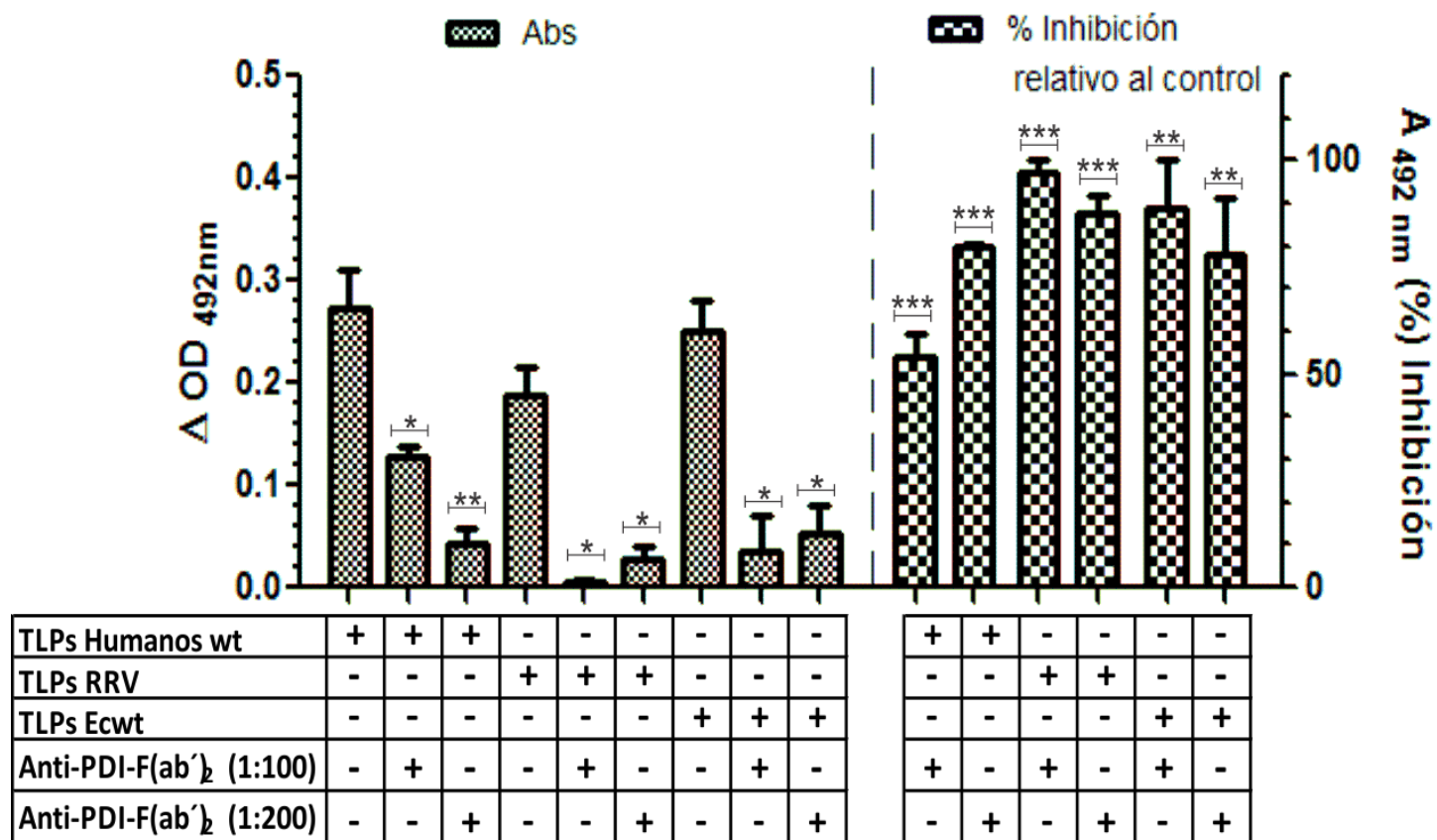
ANEXO B. FIGURA 1C



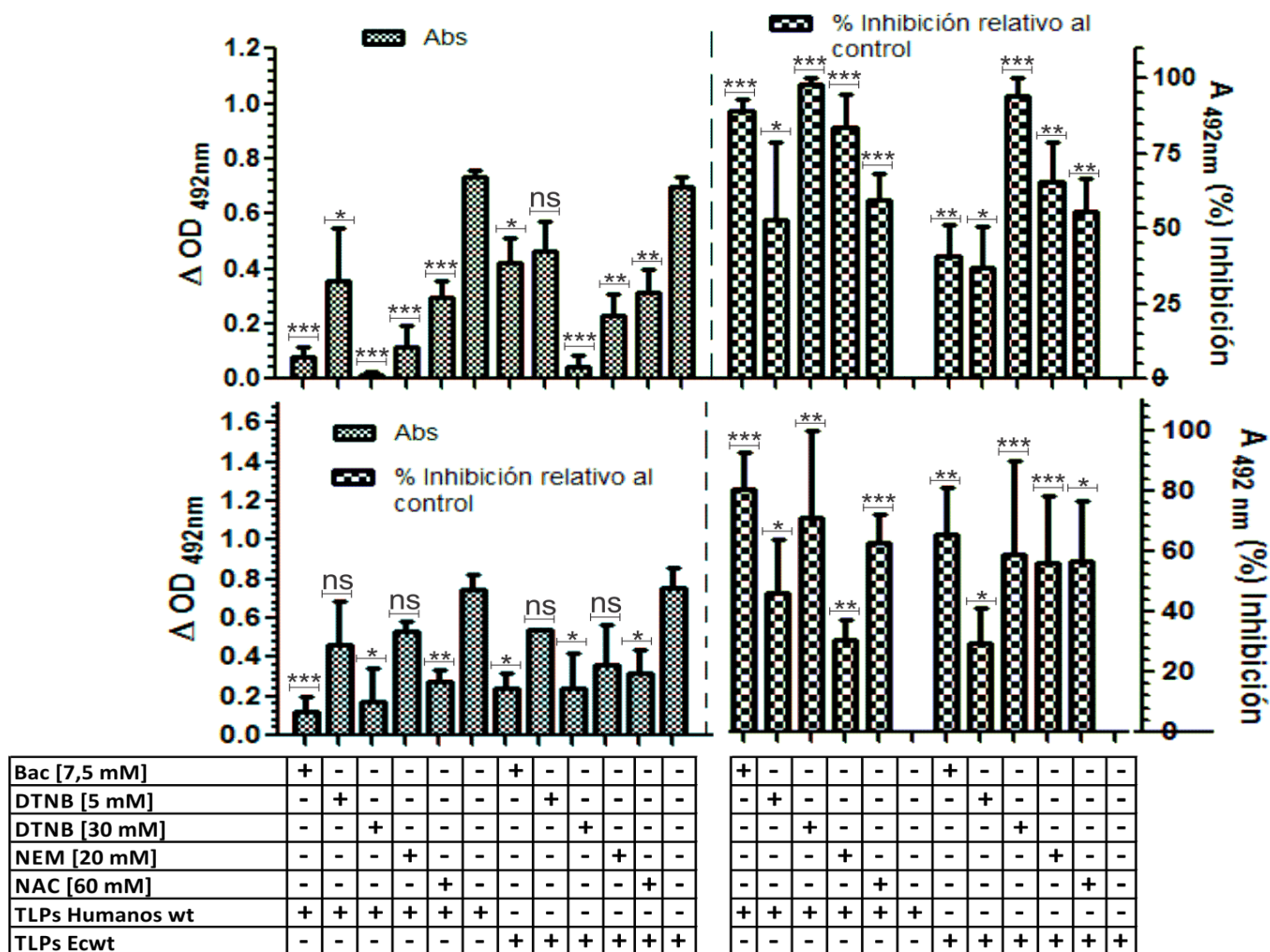
ANEXO C. FIGURA 1D



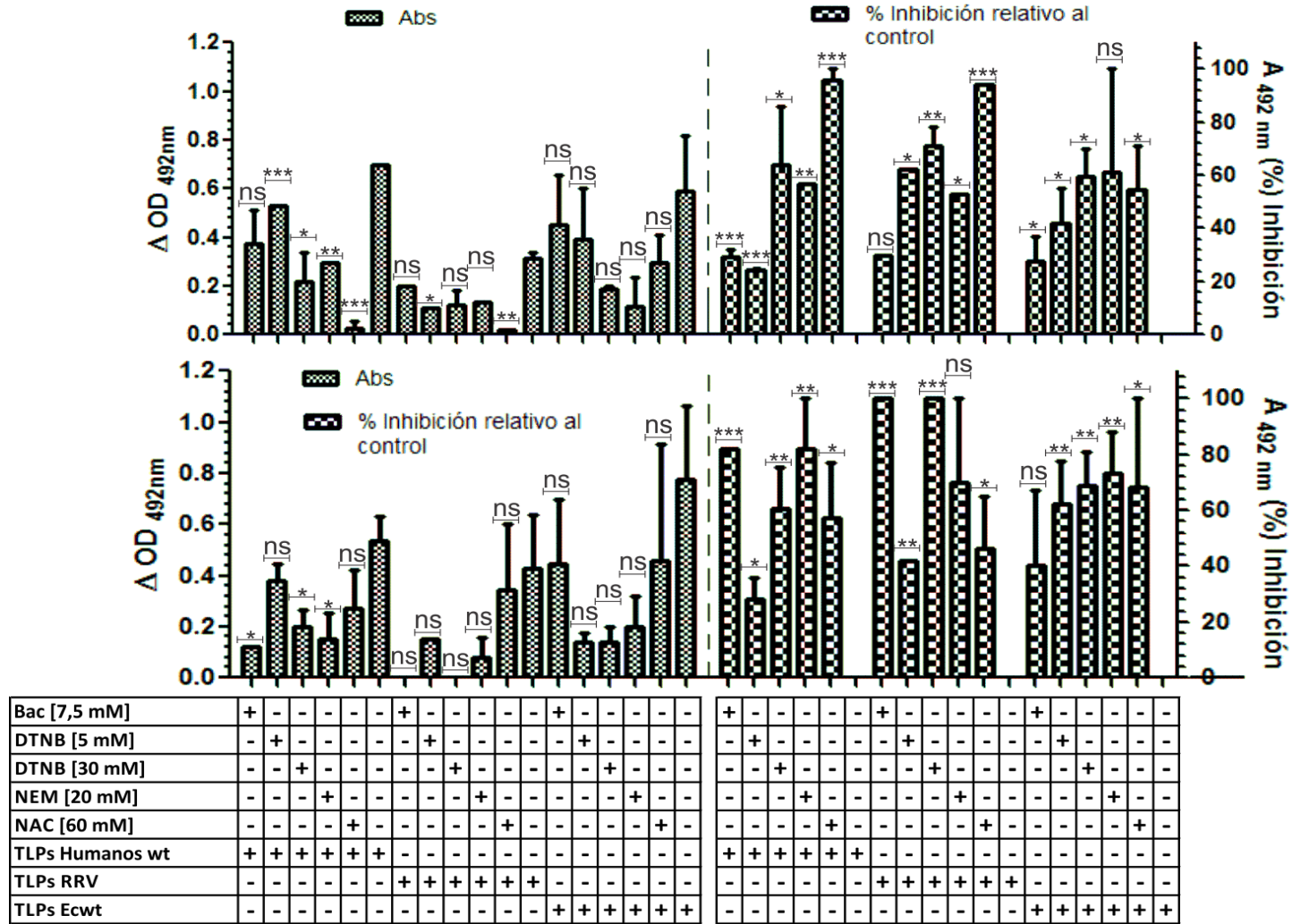
ANEXO D. 1E



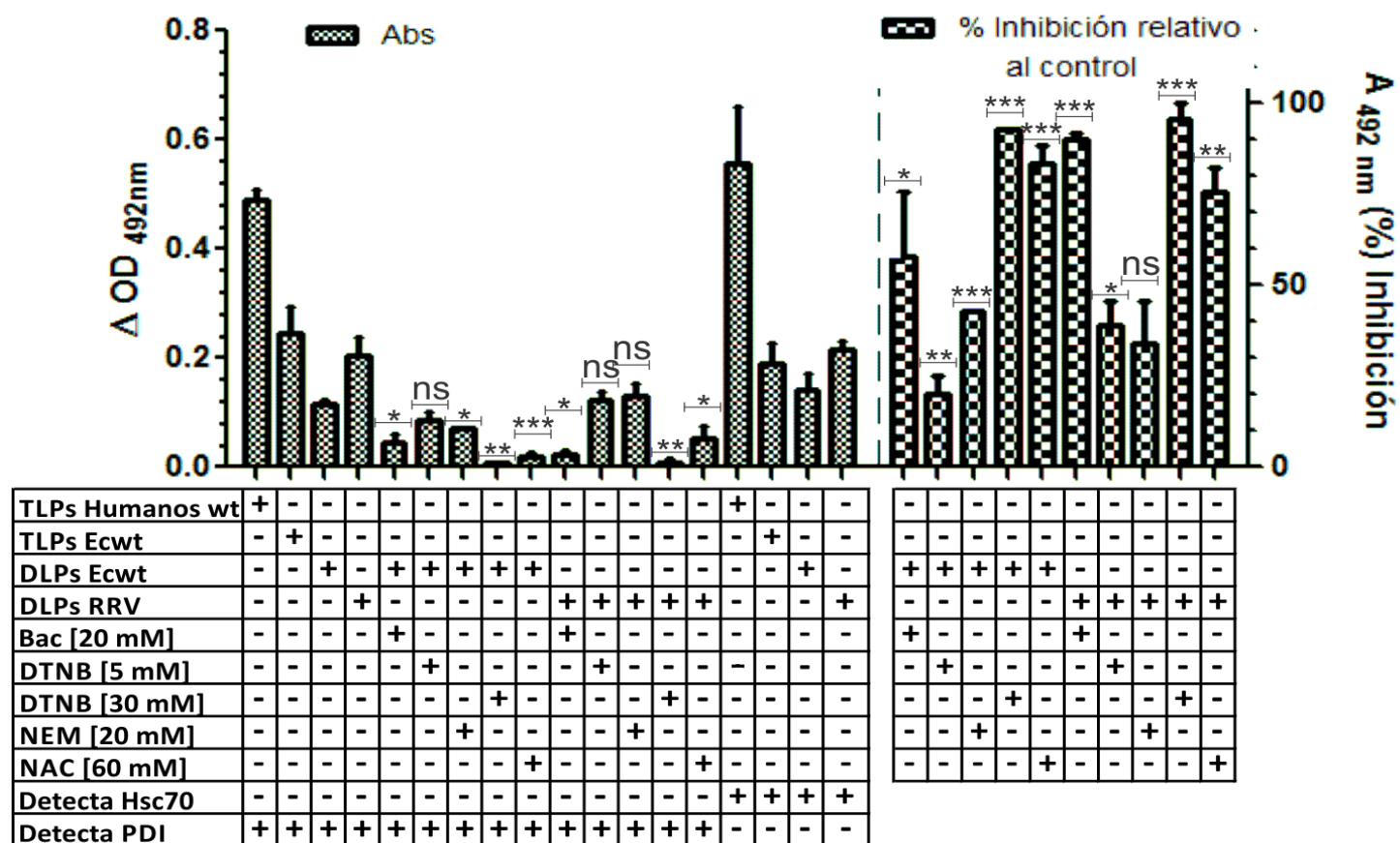
ANEXO E. FIGURA 1F



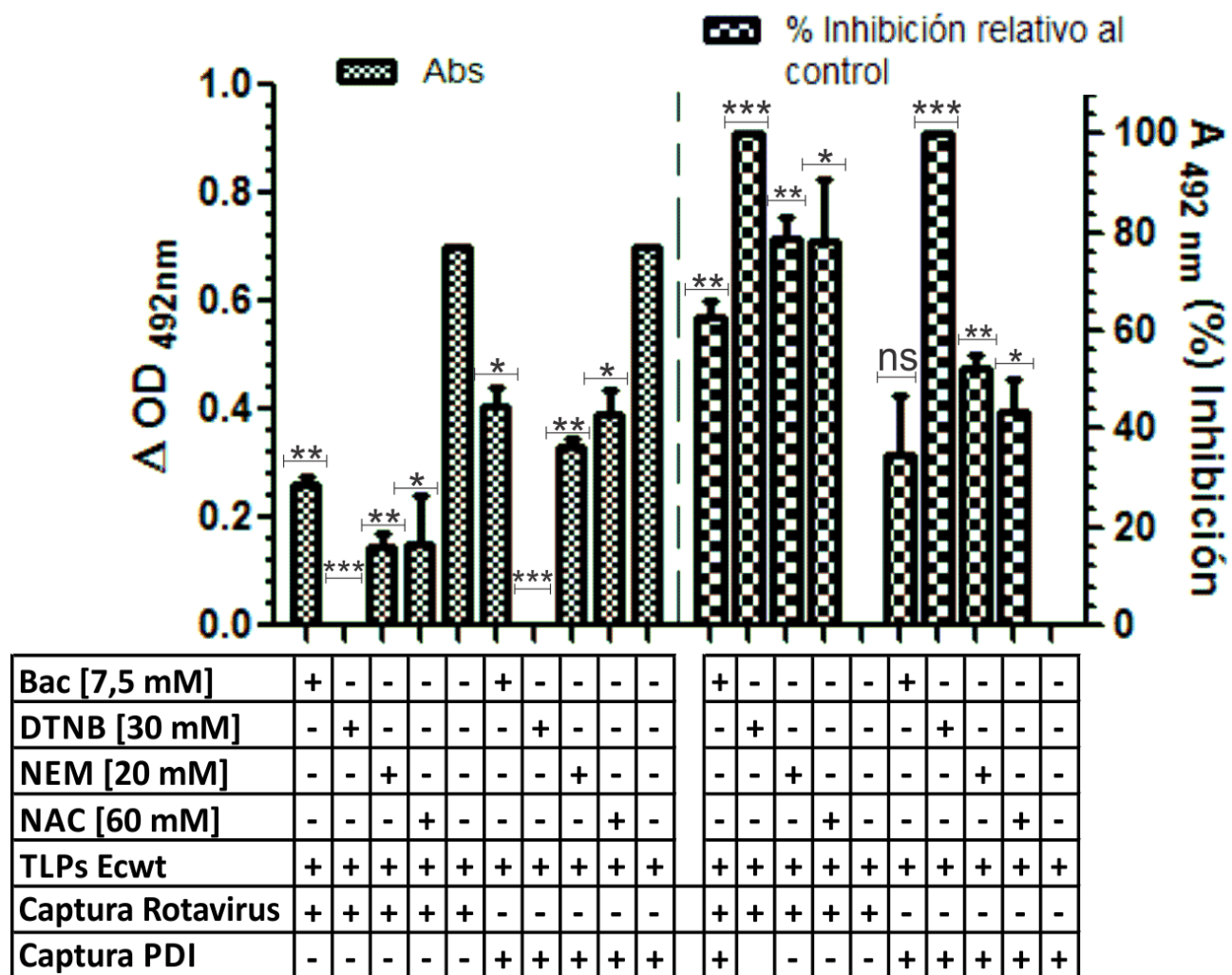
ANEXO F. FIGURA 2A (SUPERIOR) Y 2B (INFERIOR)



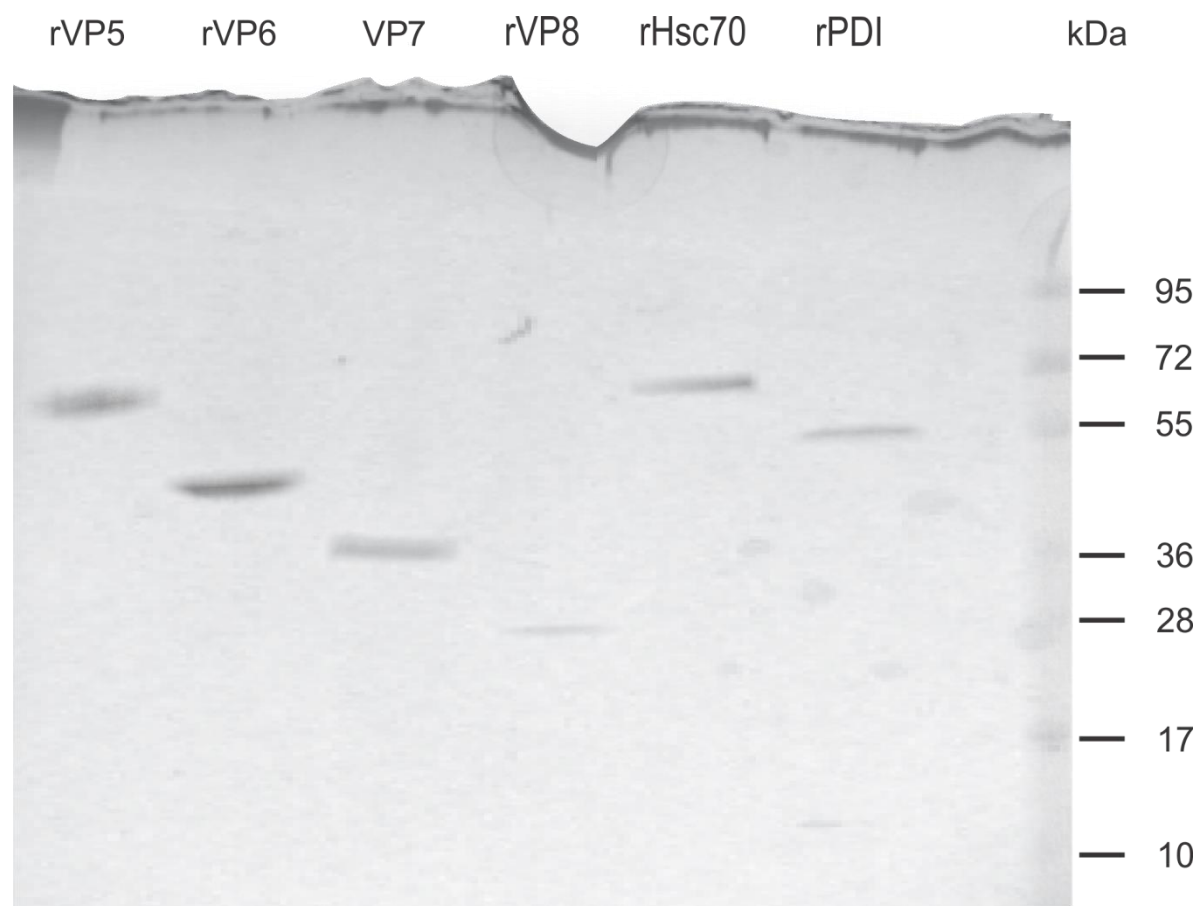
ANEXO G. FIGURA 2C (SUPERIOR) Y 2D (INFERIOR)



ANEXO H. FIGURA 2E

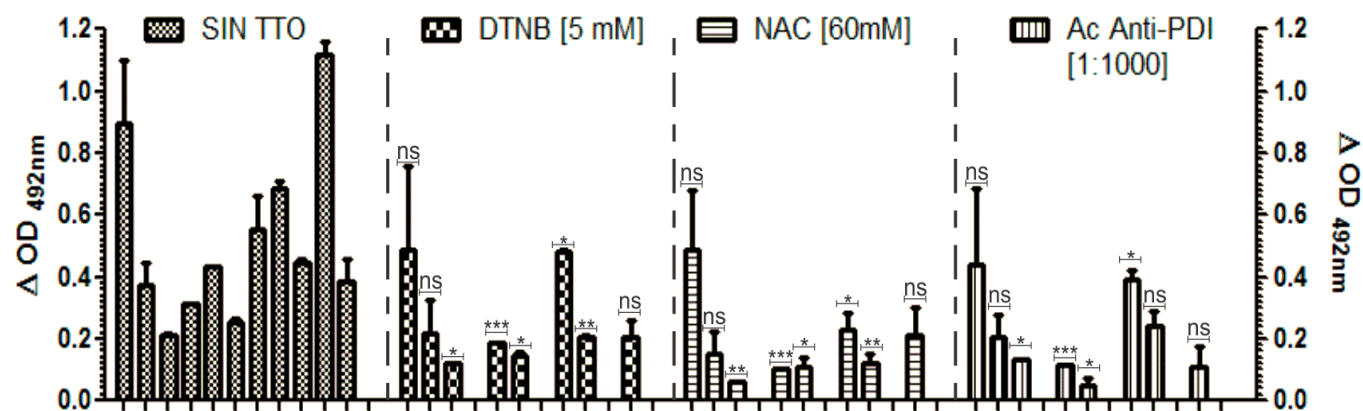


ANEXO I. FIGURA 2F



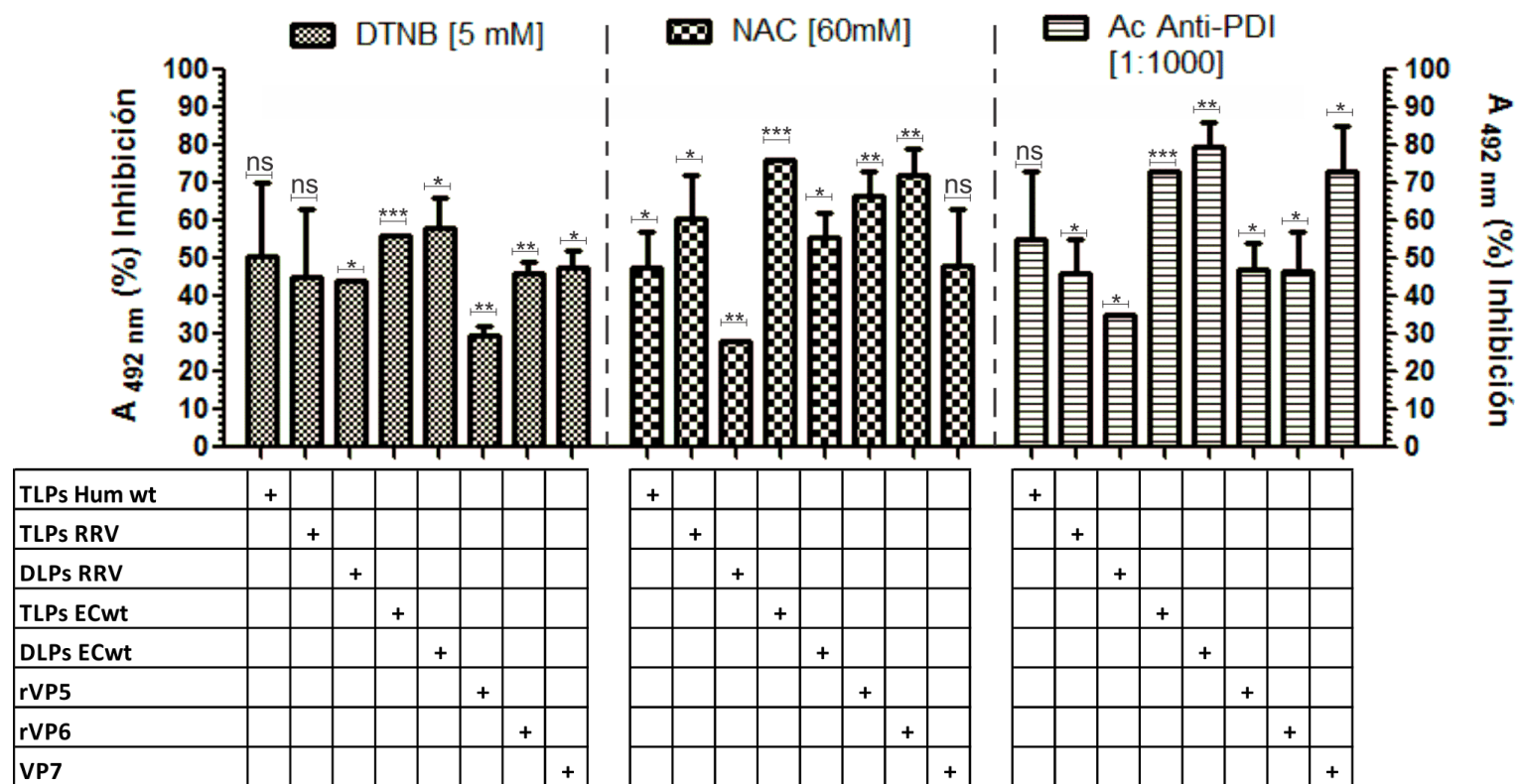
ANEXO J. FIGURA 3A

B



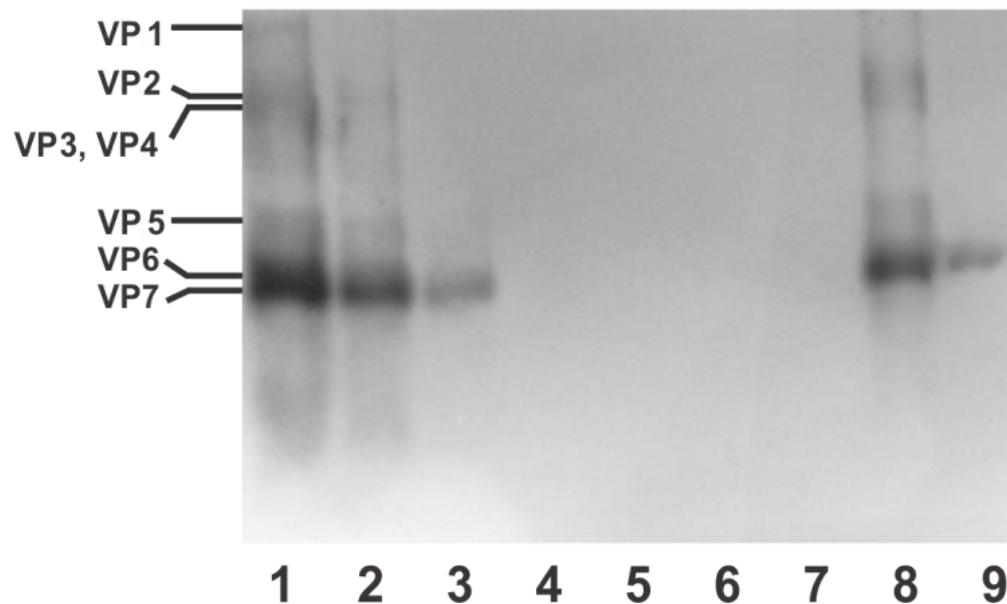
PDI [40 ng/ μ L]	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+
Hsc70 [60 ng/ μ L]				+			+			+		
TLPs Humanos wt [20 ng/ μ L]	+											
TLPs RRV [15 ng/ μ L]	+											
DLPs RRV [15 ng/ μ L]		+	+									
TLPs Ecwt [15 ng/ μ L]				+								
DLPs Ecwt [15 ng/ μ L]					+	+						
rVP5 [10 ng/ μ L]							+					
rVP6 [25 ng/ μ L]								+	+			
VP7 [25 ng/ μ L]										+		
rVP8 [20 ng/ μ L]											+	
Detección: Anti-Rotavirus	+	+		+								
Detección Anti-VP			+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

ANEXO K. FIGURA 3B

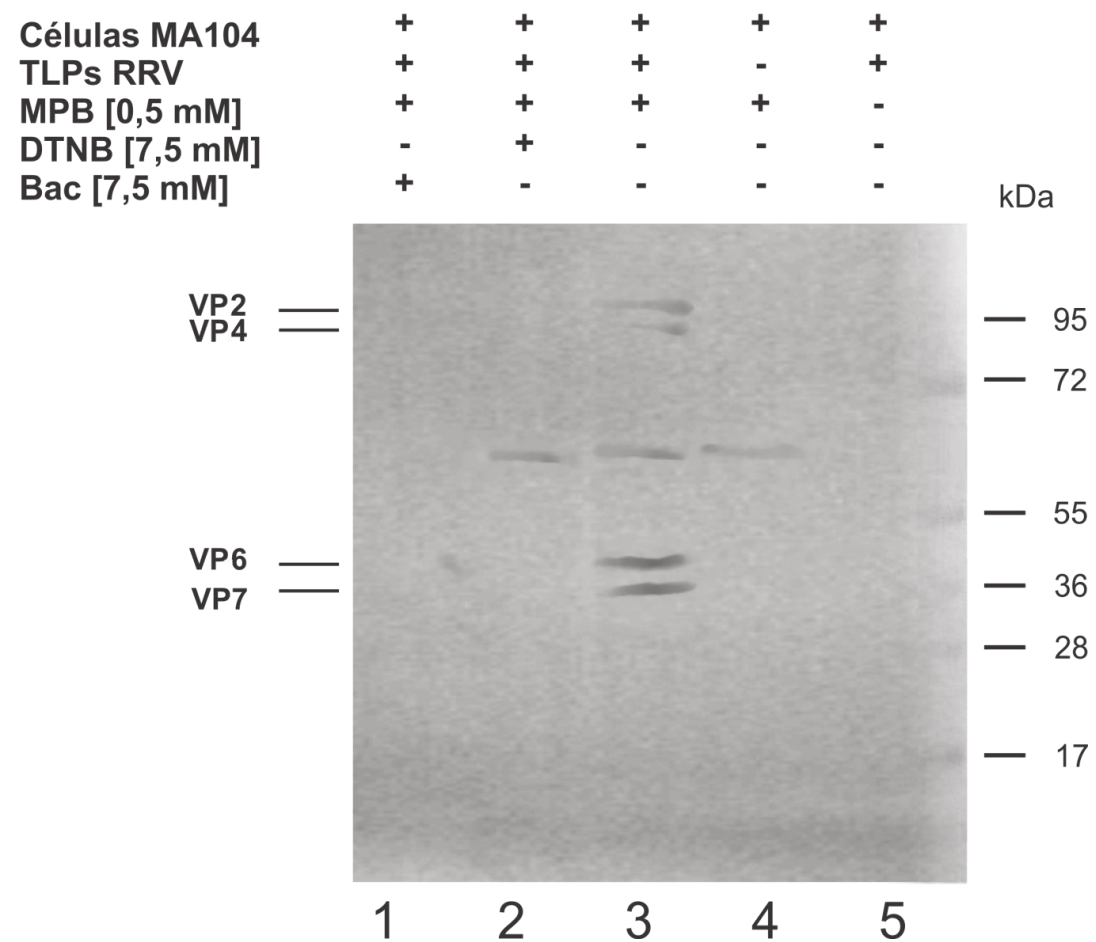


ANEXO L. FIGURA 3C

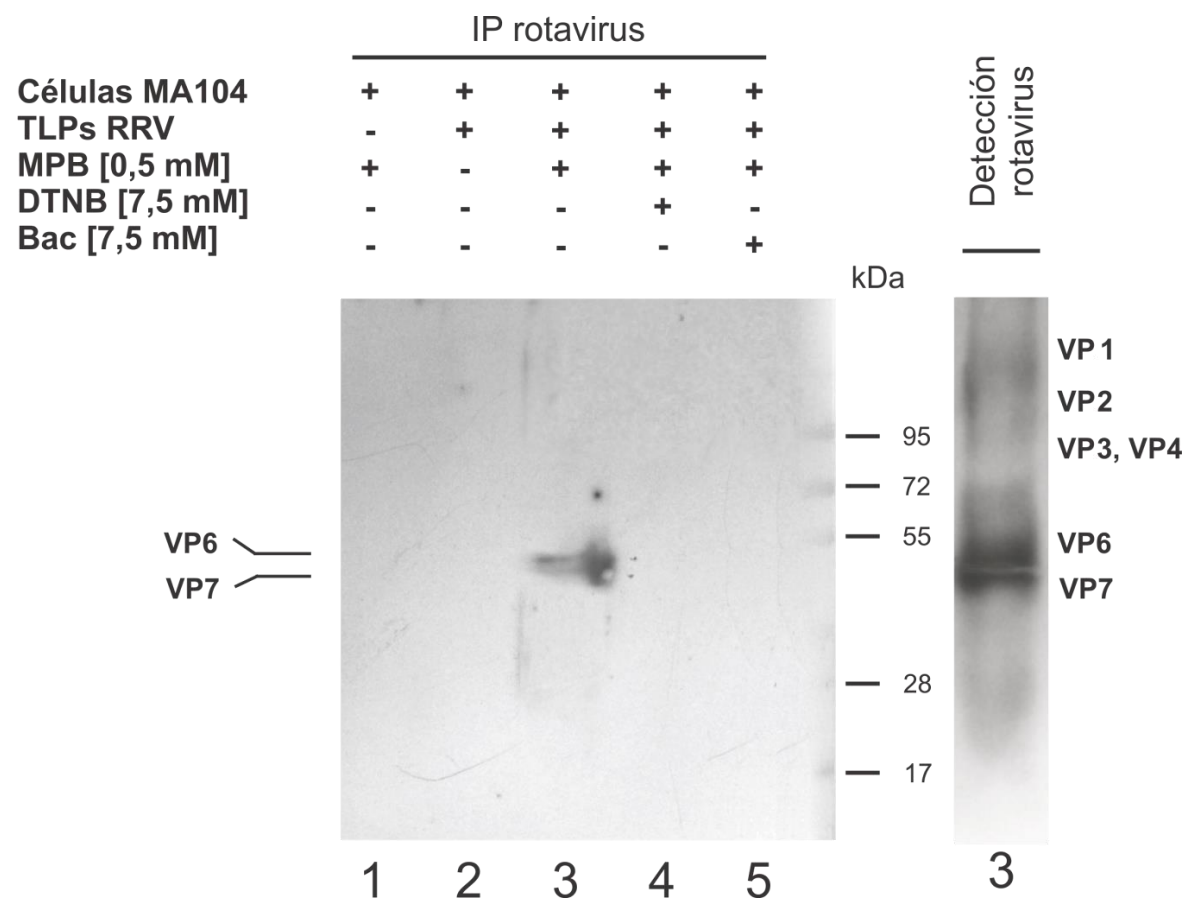
TLPs Humanos wt	+	+	+	+	+	+	+	+	+
[131,88 ng/μL]									
Tripsina [1 μg/mL]	+	+	+	+	+	-	-	-	-
DTT [5 mM]	+	+	+	-	-	-	-	+	+
MPB [0,5 mM]	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Volumen (mL)	20	10	5	10	5	10	5	10	5



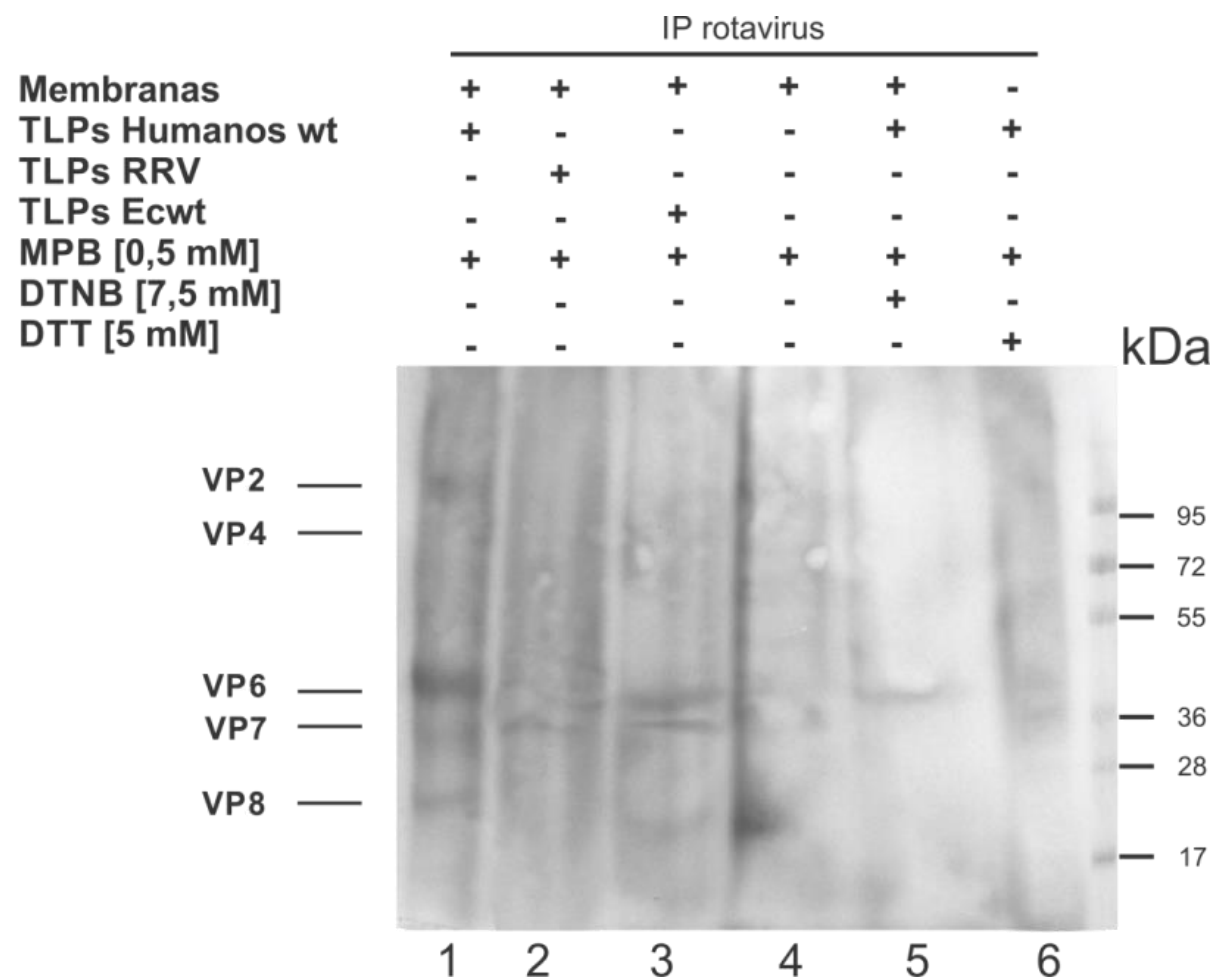
ANEXO M. FIGURA 4A



ANEXO N. FIGURA 4B



ANEXO O. FIGURA 4C



ANEXO P. FIGURA 4D

REFERENCIAS

- (1998). "[The World Medical Association (WMA). The WMA declaration of Helsinki 1960 with recommendations on biomedical research on human subjects (modified in 1975, 1980 and 1989)]." Chirurgia (Bucur) **93**(2): 138-140.
- Acosta, O., M. N. Calderon, et al. (2009). "Un modelo del mecanismo de entrada de los rotavirus a la célula hospedera." Revista Facultad de Medicina Universidad Nacional de Colombia **57**(2): 124-148.
- Alexander, D. J., R. J. Manvell, et al. (1997). "Antigenic diversity and similarities detected in avian paramyxovirus type 1 (Newcastle disease virus) isolates using monoclonal antibodies." Avian Pathol **26**(2): 399-418.
- Anfossi, G., I. Russo, et al. (2001). "N-acetyl-L-cysteine exerts direct anti-aggregating effect on human platelets." Eur J Clin Invest **31**(5): 452-461.
- Aoki, S. T., E. C. Settembre, et al. (2009). "Structure of rotavirus outer-layer protein VP7 bound with a neutralizing Fab." Science **324**(5933): 1444-1447.
- Aoki, S. T., S. D. Trask, et al. (2011). "Cross-linking of rotavirus outer capsid protein VP7 by antibodies or disulfides inhibits viral entry." J Virol **85**(20): 10509-10517.
- Ardissino, D., P. A. Merlini, et al. (1997). "Effect of transdermal nitroglycerin or N-acetylcysteine, or both, in the long-term treatment of unstable angina pectoris." J Am Coll Cardiol **29**(5): 941-947.
- Arias, C. F., P. Isa, et al. (2002). "Molecular biology of rotavirus cell entry." Arch Med Res **33**(4): 356-361.
- Aruoma, O. I., B. Halliwell, et al. (1989). "The antioxidant action of N-acetylcysteine: its reaction with hydrogen peroxide, hydroxyl radical, superoxide, and hypochlorous acid." Free Radic Biol Med **6**(6): 593-597.
- Baba, M. (2004). "Inhibitors of HIV-1 gene expression and transcription." Curr Top Med Chem **4**(9): 871-882.
- Barak, N. N., P. Neumann, et al. (2009). "Crystal structure and functional analysis of the protein disulfide isomerase-related protein ERp29." J Mol Biol **385**(5): 1630-1642.
- Barreto, A. (2010). Proteínas de choque térmico y vesículas de membrana como posibles inmunomoduladores producidos durante la infección por rotavirus de células epiteliales intestinales. Facultad de Ciencias. Bogotá D.C, Pontificia Universidad Javeriana.
- Bassuk, J. A. and R. A. Berg (1989). "Protein disulphide isomerase, a multifunctional endoplasmic reticulum protein." Matrix **9**(3): 244-258.
- Brok, J., N. Buckley, et al. (2006). "Interventions for paracetamol (acetaminophen) overdose." Cochrane Database Syst Rev(2): CD003328.
- Bukau, B., J. Weissman, et al. (2006). "Molecular chaperones and protein quality control." Cell **125**(3): 443-451.
- Bulleid, N. J. and L. Ellgaard (2011). "Multiple ways to make disulfides." Trends Biochem Sci **36**(9): 485-492.

- Calderón, M. (2010). Actividad Disulfuro Isomerasa de la Superficie Celular Sobre el Durante los Eventos Iniciales del Proceso Infeccioso. Departamento de Ciencias Fisiológicas, Facultad de Medicina. Bogotá Colombia, Universidad Nacional de Colombia. **Doctorado**.
- Calderón, M., F. Guzmán, et al. (2012). "Rotavirus VP4 and VP7-Derived Synthetic Peptides as Potential Substrates of Protein Disulfide Isomerase Lead to Inhibition of Rotavirus Infection." International Journal of Peptide Research and Therapeutics **18**(4): 373-382.
- Calderon, M. N., C. A. Guerrero, et al. (2012). "Inhibiting rotavirus infection by membrane-impermeant thiol/disulfide exchange blockers and antibodies against protein disulfide isomerase." Intervirol **55**(6): 451-464.
- Calderón, M. N., C. A. Guerrero, et al. (2011). "Interacción de rotavirus con la proteína disulfuro-isomerasa in vitro y en sistemas celulares." Biomédica **31**: 70-81.
- Campos, S. K., J. A. Chapman, et al. (2012). "Opposing effects of bacitracin on human papillomavirus type 16 infection: enhancement of binding and entry and inhibition of endosomal penetration." J Virol **86**(8): 4169-4181.
- Cely R., D. J., Pulido D., Acosta O., Guerrero C (2006). "Producción de la proteína de choque térmico Hsc70 recombinante en Escherichia Coli BL21(DE3) para generar anticuerpos policlonales." Revista Facultad de Medicina Universidad Nacional de Colombia **54**(3): 156-168.
- Ciarlet, M., S. E. Crawford, et al. (2002). "VLA-2 (alpha2beta1) integrin promotes rotavirus entry into cells but is not necessary for rotavirus attachment." J Virol **76**(3): 1109-1123.
- Couet, J., S. de Bernard, et al. (1996). "Cell surface protein disulfide-isomerase is involved in the shedding of human thyrotropin receptor ectodomain." Biochemistry **35**(47): 14800-14805.
- Coulson, B. S., S. L. Londrigan, et al. (1997). "Rotavirus contains integrin ligand sequences and a disintegrin-like domain that are implicated in virus entry into cells." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(10): 5389-5394.
- Chen, J. Z., E. C. Settembre, et al. (2009). "Molecular interactions in rotavirus assembly and uncoating seen by high-resolution cryo-EM." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(26): 10644-10648.
- Darby, N. J., E. Penka, et al. (1998). "The multi-domain structure of protein disulfide isomerase is essential for high catalytic efficiency." J Mol Biol **276**(1): 239-247.
- De Flora, S., C. Grassi, et al. (1997). "Attenuation of influenza-like symptomatology and improvement of cell-mediated immunity with long-term N-acetylcysteine treatment." Eur Respir J **10**(7): 1535-1541.
- Dean, O., F. Giorlando, et al. (2011). "N-acetylcysteine in psychiatry: current therapeutic evidence and potential mechanisms of action." J Psychiatry Neurosci **36**(2): 78-86.
- Dickerhof, N., T. Kleffmann, et al. (2011). "Bacitracin inhibits the reductive activity of protein disulfide isomerase by disulfide bond formation with free cysteines in the substrate-binding domain." FEBS J **278**(12): 2034-2043.
- Dormitzer, P. R., H. B. Greenberg, et al. (2001). "Proteolysis of monomeric recombinant rotavirus VP4 yields an oligomeric VP5* core." J Virol **75**(16): 7339-7350.
- Dormitzer, P. R., E. B. Nason, et al. (2004). "Structural rearrangements in the membrane penetration protein of a non-enveloped virus." Nature **430**(7003): 1053-1058.

- Ellgaard, L. and L. W. Ruddock (2005). "The human protein disulphide isomerase family: substrate interactions and functional properties." EMBO Rep **6**(1): 28-32.
- Espejo, R. T., S. Lopez, et al. (1981). "Structural polypeptides of simian rotavirus SA11 and the effect of trypsin." J Virol **37**(1): 156-160.
- Essex, D. W., K. Chen, et al. (1995). "Localization of protein disulfide isomerase to the external surface of the platelet plasma membrane." Blood **86**(6): 2168-2173.
- Essex, D. W. and M. Li (1999). "Protein disulphide isomerase mediates platelet aggregation and secretion." Br J Haematol **104**(3): 448-454.
- Estes, M. K. and J. Cohen (1989). "Rotavirus gene structure and function." Microbiol Rev **53**(4): 410-449.
- Fenouillet, E., R. Barbouche, et al. (2001). "The catalytic activity of protein disulfide isomerase is involved in human immunodeficiency virus envelope-mediated membrane fusion after CD4 cell binding." J Infect Dis **183**(5): 744-752.
- Fleming, F. E., K. L. Graham, et al. (2011). "Determinants of the specificity of rotavirus interactions with the alpha2beta1 integrin." J Biol Chem **286**(8): 6165-6174.
- Frangioni, J. V. and B. G. Neel (1993). "Solubilization and purification of enzymatically active glutathione S-transferase (pGEX) fusion proteins." Anal Biochem **210**(1): 179-187.
- Gallina, A., T. M. Hanley, et al. (2002). "Inhibitors of protein-disulfide isomerase prevent cleavage of disulfide bonds in receptor-bound glycoprotein 120 and prevent HIV-1 entry." J Biol Chem **277**(52): 50579-50588.
- Garigliany, M. M. and D. J. Desmecht (2011). "N-acetylcysteine lacks universal inhibitory activity against influenza A viruses." J Negat Results Biomed **10**: 5.
- Gibon, J., P. Tu, et al. (2010). "The thiol-modifying agent N-ethylmaleimide elevates the cytosolic concentration of free Zn²⁺ but not of Ca²⁺ in murine cortical neurons." Cell Calcium **48**(1): 37-43.
- Gómez, D. L. (2013). Evaluación De La Expresión De Las Proteínas Pparγ Y Nfκb En Velloidades Intestinales De Ratones Adultos ICR Infectados Con Rotavirus Ecwt Y Tratados Con Pioglitazona. Departamento de Ciencias Fisiológicas, Facultad de Medicina. Universidad Nacional de Colombia. Maestría
- Gowthaman, U., M. Jayakanthan, et al. (2008). "Molecular docking studies of dithionitrobenzoic acid and its related compounds to protein disulfide isomerase: computational screening of inhibitors to HIV-1 entry." BMC Bioinformatics **9 Suppl 12**: S14.
- Graham, K. L., P. Halasz, et al. (2003). "Integrin-using rotaviruses bind alpha2beta1 integrin alpha2 I domain via VP4 DGE sequence and recognize alphaXbeta2 and alphaVbeta3 by using VP7 during cell entry." J Virol **77**(18): 9969-9978.
- Graham, K. L., Y. Takada, et al. (2006). "Rotavirus spike protein VP5* binds alpha2beta1 integrin on the cell surface and competes with virus for cell binding and infectivity." J Gen Virol **87**(Pt 5): 1275-1283.
- Greenberg, H. B. and M. K. Estes (2009). "Rotaviruses: from pathogenesis to vaccination." Gastroenterology **136**(6): 1939-1951.

- Gualtero, D. F., F. Guzman, et al. (2007). "Amino acid domains 280-297 of VP6 and 531-554 of VP4 are implicated in heat shock cognate protein hsc70-mediated rotavirus infection." Arch Virol **152**(12): 2183-2196.
- Guerrero, C. A., M. Calderón, et al. (2008) "Interferencia de la Infección por Rotavirus Mediante la Inhibición de la Actividad de la Proteína Disulfuro Isomerasa (PDI) de la Membrana Celular de las Líneas MA104 y CACO-2." Revista de Medicina **30**, 229-258.
- Guerrero, C. A. and L. P. Moreno (2012). "Rotavirus receptor proteins Hsc70 and integrin alphavbeta3 are located in the lipid microdomains of animal intestinal cells." Acta Virol **56**(1): 63-70.
- Guerrero, C. A., A. Murillo, et al. (2012). "Inhibition of rotavirus infection in cultured cells by N-acetyl-cysteine, PPARgamma agonists and NSAIDs." Antiviral Res **96**(1): 1-12.
- Guerrero, C. A., V. R. Paula Pardo, et al. (2013). "Inhibition of rotavirus ECwt infection in ICR suckling mice by N-acetylcysteine, peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists and cyclooxygenase-2 inhibitors." Mem Inst Oswaldo Cruz **108**(6): 741-754.
- Guerrero, C. A., A. Y. Santana, et al. (2010). "Mouse intestinal villi as a model system for studies of rotavirus infection." J Virol Methods **168**(1-2): 22-30.
- Guerrero, C. A., S. Zarate, et al. (2000). "Biochemical characterization of rotavirus receptors in MA104 cells." J Virol **74**(20): 9362-9371.
- Guthapfel, R., P. Gueguen, et al. (1996). "Reexamination of hormone-binding properties of protein disulfide-isomerase." Eur J Biochem **242**(2): 315-319.
- Gutierrez, M., P. Isa, et al. (2010). "Different rotavirus strains enter MA104 cells through different endocytic pathways: the role of clathrin-mediated endocytosis." J Virol **84**(18): 9161-9169.
- Hatahet, F. and L. W. Ruddock (2009). "Modulating proteostasis: peptidomimetic inhibitors and activators of protein folding." Curr Pharm Des **15**(21): 2488-2507.
- Hatahet, F. and L. W. Ruddock (2009). "Protein disulfide isomerase: a critical evaluation of its function in disulfide bond formation." Antioxid Redox Signal **11**(11): 2807-2850.
- Hewish, M. J., Y. Takada, et al. (2000). "Integrins alpha2beta1 and alpha4beta1 can mediate SA11 rotavirus attachment and entry into cells." J Virol **74**(1): 228-236.
- Huang, E. M., T. C. Detwiler, et al. (1997). "Thiol-disulfide isomerization in thrombospondin: effects of conformation and protein disulfide isomerase." Blood **89**(9): 3205-3212.
- Ikeda, M., M. Sagara, et al. (2001). "The sulphydryl reagent, N-ethylmaleimide, disrupts sleep and blocks A1 adenosine receptor-mediated inhibition of intracellular calcium signaling in the in vitro ventromedial preoptic nucleus." Neuroscience **106**(4): 733-743.
- Ishii, Y., K. Kondo, et al. (2007). "Thiol-reactive reagents inhibits intracellular trafficking of human papillomavirus type 16 pseudovirions by binding to cysteine residues of major capsid protein L1." Virol J **4**: 110.
- Jain, S., L. W. McGinnes, et al. (2007). "Thiol/disulfide exchange is required for membrane fusion directed by the Newcastle disease virus fusion protein." J Virol **81**(5): 2328-2339.
- Jain, S., L. W. McGinnes, et al. (2009). "Role of thiol/disulfide exchange in newcastle disease virus entry." J Virol **83**(1): 241-249.
- Karala, A. R. and L. W. Ruddock (2010). "Bacitracin is not a specific inhibitor of protein disulfide isomerase." FEBS J **277**(11): 2454-2462.

- Kim, I. S., S. D. Trask, et al. (2010). "Effect of mutations in VP5 hydrophobic loops on rotavirus cell entry." J Virol **84**(12): 6200-6207.
- Kim, J.-A., Y. S. Kang, et al. (2001). "Role of reactive oxygen species in apoptosis induced by N-ethylmaleimide in HepG2 human hepatoblastoma cells." European Journal of Pharmacology **433**(1): 1-6.
- Klappa, P., L. W. Ruddock, et al. (1998). "The b' domain provides the principal peptide-binding site of protein disulfide isomerase but all domains contribute to binding of misfolded proteins." EMBO J **17**(4): 927-935.
- Kozlov, G., P. Maattanen, et al. (2010). "A structural overview of the PDI family of proteins." FEBS J **277**(19): 3924-3936.
- Laboissiere, M. C., P. T. Chivers, et al. (1995). "Production of rat protein disulfide isomerase in *Saccharomyces cerevisiae*." Protein Expr Purif **6**(5): 700-706.
- Lai, K. Y., W. Y. Ng, et al. (2010). "High-dose N-acetylcysteine therapy for novel H1N1 influenza pneumonia." Ann Intern Med **152**(10): 687-688.
- Lappi, A. K., M. F. Lensink, et al. (2004). "A conserved arginine plays a role in the catalytic cycle of the protein disulphide isomerases." J Mol Biol **335**(1): 283-295.
- Lara, H. H., L. Ixtepan-Turrent, et al. (2011). "Antiviral properties of 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid and bacitracin against T-tropic human immunodeficiency virus type 1." Virology **8**: 137.
- Laurindo, F. R., L. A. Pescatore, et al. (2012). "Protein disulfide isomerase in redox cell signaling and homeostasis." Free Radic Biol Med **52**(9): 1954-1969.
- Li, Z., M. L. Baker, et al. (2009). "Rotavirus architecture at subnanometer resolution." J Virol **83**(4): 1754-1766.
- Lin, P. H., R. Selinfreund, et al. (1987). "Rapid and efficient purification of plasma membrane from cultured cells: characterization of epidermal growth factor binding." Biochemistry **26**(3): 731-736.
- Lioy, J., W. Z. Ho, et al. (1993). "Thiol suppression of human immunodeficiency virus type 1 replication in primary cord blood monocyte-derived macrophages in vitro." J Clin Invest **91**(2): 495-498.
- Londrigan, S. L., K. L. Graham, et al. (2003). "Monkey rotavirus binding to alpha2beta1 integrin requires the alpha2 I domain and is facilitated by the homologous beta1 subunit." J Virol **77**(17): 9486-9501.
- Loya, S., H. Q. Gao, et al. (1997). "Subunit-specific mutagenesis of the cysteine 280 residue of the reverse transcriptase of human immunodeficiency virus type 1: effects on sensitivity to a specific inhibitor of the RNase H activity." J Virol **71**(7): 5668-5672.
- Mandel, R., H. J. Ryser, et al. (1993). "Inhibition of a reductive function of the plasma membrane by bacitracin and antibodies against protein disulfide-isomerase." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(9): 4112-4116.
- Markovic, I., T. S. Stantchev, et al. (2004). "Thiol/disulfide exchange is a prerequisite for CXCR4-tropic HIV-1 envelope-mediated T-cell fusion during viral entry." Blood **103**(5): 1586-1594.
- Mata, M., E. Morcillo, et al. (2011). "N-acetyl-L-cysteine (NAC) inhibit mucin synthesis and pro-inflammatory mediators in alveolar type II epithelial cells infected with influenza virus A and B and with respiratory syncytial virus (RSV)." Biochem Pharmacol **82**(5): 548-555.

- Mata, M., I. Sarrion, et al. (2012). "Respiratory syncytial virus inhibits ciliogenesis in differentiated normal human bronchial epithelial cells: effectiveness of N-acetylcysteine." PLoS One **7**(10): e48037.
- Mathieu, M., I. Petitpas, et al. (2001). "Atomic structure of the major capsid protein of rotavirus: implications for the architecture of the virion." EMBO J **20**(7): 1485-1497.
- Mayorga, D., L. Rubio, et al. (2010). "Las proteínas Beta 3 y PDI aisladas de Plaquetas humanas se unen con el Rotavirus ECwt in vitro. ." Revista Facultad de Medicina Universidad Nacional de Colombia **58**(2): 115-127.
- Mercer, J., M. Schelhaas, et al. (2010). "Virus entry by endocytosis." Annu Rev Biochem **79**: 803-833.
- Millea, P. J. (2009). "N-acetylcysteine: multiple clinical applications." Am Fam Physician **80**(3): 265-269.
- Ming, L. J. and J. D. Epperson (2002). "Metal binding and structure-activity relationship of the metalloantibiotic peptide bacitracin." J Inorg Biochem **91**(1): 46-58.
- Mirazimi, A. and L. Svensson (1998). "Carbohydrates facilitate correct disulfide bond formation and folding of rotavirus VP7." J Virol **72**(5): 3887-3892.
- Monnier, N., K. Higo-Moriguchi, et al. (2006). "High-resolution molecular and antigen structure of the VP8* core of a sialic acid-independent human rotavirus strain." J Virol **80**(3): 1513-1523.
- Moreno, L. Y. (2010). Expresión y Purificación de las Proteínas Recombinantes Estructurales VP5, VP6 Y VP8 del Rotavirus. Departamento de Ciencias Fisiológicas, Facultad de Medicina. Bogotá Colombia, Universidad Nacional de Colombia. Maestría.
- Moreno, L. Y., C. A. Guerrero, et al. (2013). "Expresión y purificación de las proteínas estructurales del rotavirus VP5* y VP8* en bacterias E. coli BL21(DE3)." Revista Colombiana de Biotecnología **15**(1): 82-97.
- Mortola, E., M. Okuda, et al. (1998). "Inhibition of apoptosis and virus replication in feline immunodeficiency virus-infected cells by N-acetylcysteine and ascorbic acid." J Vet Med Sci **60**(11): 1187-1193.
- Ong, J. and D. I. B. Kerr (1995). "Interactions of N-ethylmaleimide and aluminium fluoride with GABAB receptor function in rat neocortical slices." European Journal of Pharmacology **287**(2): 197-200.
- Parnaik, V. K. and M. R. Das (1981). "Template-binding site of AMV reverse transcriptase and inactivation of the enzyme by N-ethylmaleimide." Biochim Biophys Acta **655**(2): 181-188.
- Patton, J. T., J. Hua, et al. (1993). "Location of intrachain disulfide bonds in the VP5* and VP8* trypsin cleavage fragments of the rhesus rotavirus spike protein VP4." J Virol **67**(8): 4848-4855.
- Pesavento, J. B., S. E. Crawford, et al. (2005). "pH-induced conformational change of the rotavirus VP4 spike: implications for cell entry and antibody neutralization." J Virol **79**(13): 8572-8580.
- Pfeffer, S., W. Hohne, et al. (1991). "X-Ray structure of the antibiotic bacitracin A." FEBS Lett **285**(1): 115-119.

- Pirneskoski, A., P. Klappa, et al. (2004). "Molecular characterization of the principal substrate binding site of the ubiquitous folding catalyst protein disulfide isomerase." J Biol Chem **279**(11): 10374-10381.
- Poncet, D., G. Corthier, et al. (1990). "A recombinant vaccinia virus expressing the major capsid protein of Simian rotavirus-induced anti-rotavirus antibodies." Virus Res **15**(3): 267-274.
- Reiser, K., K. O. Francois, et al. (2012). "Thioredoxin-1 and protein disulfide isomerase catalyze the reduction of similar disulfides in HIV gp120." Int J Biochem Cell Biol **44**(3): 556-562.
- Richardson, T. C., D. V. Chapman, et al. (1983). "Immunoperoxidase techniques: the deleterious effect of sodium azide on the activity of peroxidase conjugates." J Clin Pathol **36**(4): 411-414.
- Riordan, J. F. and B. L. Vallee (1972). "[36] Reactions with N-ethylmaleimide and p-mercuribenzoate." Methods Enzymol **25**: 449-456.
- Romagnoli, C., T. Marcucci, et al. (2012). "Role of N-acetylcysteine and GSH redox system on total and active MMP-2 in intestinal myofibroblasts of Crohn's disease patients." Int J Colorectal Dis.
- Ruyechan, W. T. (1988). "N-ethylmaleimide inhibition of the DNA-binding activity of the herpes simplex virus type 1 major DNA-binding protein." J Virol **62**(3): 810-817.
- Ryser, H. J., E. M. Levy, et al. (1994). "Inhibition of human immunodeficiency virus infection by agents that interfere with thiol-disulfide interchange upon virus-receptor interaction." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(10): 4559-4563.
- Santana, A. Y., C. A. Guerrero, et al. (2013). "Implication of Hsc70, PDI and integrin alphavbeta3 involvement during entry of the murine rotavirus ECwt into small-intestinal villi of suckling mice." Arch Virol **158**(6): 1323-1336.
- Schelhaas, M., J. Malmstrom, et al. (2007). "Simian Virus 40 depends on ER protein folding and quality control factors for entry into host cells." Cell **131**(3): 516-529.
- Selman-Reimer, S., R. J. Duhe, et al. (1985). "N-Ethylmaleimide inhibition of the catalytic activities of the Dunaliella salina coupling factor 1 (CF1) and the restoration of the inhibition of the CF1 ATPase activity by N-ethylmaleimide." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics **810**(3): 325-331.
- Staal, F. J., M. Roederer, et al. (1990). "Intracellular thiols regulate activation of nuclear factor kappa B and transcription of human immunodeficiency virus." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(24): 9943-9947.
- Stolf, B. S., I. Smyrniak, et al. (2011). "Protein disulfide isomerase and host-pathogen interaction." ScientificWorldJournal **11**: 1749-1761.
- Svensson, L., P. R. Dormitzer, et al. (1994). "Intracellular manipulation of disulfide bond formation in rotavirus proteins during assembly." J Virol **68**(8): 5204-5215.
- Swiatkowska, M., J. Szymanski, et al. (2008). "Interaction and functional association of protein disulfide isomerase with alphaVbeta3 integrin on endothelial cells." FEBS J **275**(8): 1813-1823.
- Tamayo, L. and B. Moreno "Actualización Rotavirus." **52**.

- Terada, K., P. Manchikalapudi, et al. (1995). "Secretion, surface localization, turnover, and steady state expression of protein disulfide isomerase in rat hepatocytes." J Biol Chem **270**(35): 20410-20416.
- Tian, G., F. X. Kober, et al. (2008). "The catalytic activity of protein-disulfide isomerase requires a conformationally flexible molecule." J Biol Chem **283**(48): 33630-33640.
- Tian, G., S. Xiang, et al. (2006). "The crystal structure of yeast protein disulfide isomerase suggests cooperativity between its active sites." Cell **124**(1): 61-73.
- Turano, C., S. Coppari, et al. (2002). "Proteins of the PDI family: unpredicted non-ER locations and functions." J Cell Physiol **193**(2): 154-163.
- Walczak, C. P. and B. Tsai (2011). "A PDI family network acts distinctly and coordinately with ERp29 to facilitate polyomavirus infection." J Virol **85**(5): 2386-2396.
- Wallin, M., M. Ekstrom, et al. (2004). "Isomerization of the intersubunit disulphide-bond in Env controls retrovirus fusion." EMBO J **23**(1): 54-65.
- Wang, C., S. Chen, et al. (2010). "Plasticity of human protein disulfide isomerase: evidence for mobility around the X-linker region and its functional significance." J Biol Chem **285**(35): 26788-26797.
- WHO, W. H. O. (2005). "Laboratory biosafety manual." World Health Organization **3th Edition**.
- Yao, Y., Y. Zhou, et al. (1997). "Both the isomerase and chaperone activities of protein disulfide isomerase are required for the reactivation of reduced and denatured acidic phospholipase A2." EMBO J **16**(3): 651-658.
- Yoder, J. D. and P. R. Dormitzer (2006). "Alternative intermolecular contacts underlie the rotavirus VP5* two- to three-fold rearrangement." EMBO J **25**(7): 1559-1568.
- Yoder, J. D., S. D. Trask, et al. (2009). "VP5* rearranges when rotavirus uncoats." J Virol **83**(21): 11372-11377.